

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser
Abteilung Zoonosen: Professor Dr H. Krauss

**Zur Problematik der Impfstoff-Prüfung von
inaktivierten Tollwutvaccinen mit dem Habel-
und NIH-Test sowie dem Antikörperbindungstest
nach ARKO - WIKTOR - SIKES**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Hok Liang Oei
Tierarzt aus Bandung/Indonesien

Gießen 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546402_0014

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Th. Schliesser
Abteilung Zoonosen: Professor Dr H. Krauss

**Zur Problematik der Impfstoff-Prüfung von
inaktivierten Tollwutvaccinen mit dem Habel-
und NIH-Test sowie dem Antikörperbindungstest
nach ARKO - WIKTOR - SIKES**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Hok Liang Oei
Tierarzt aus Bandung/Indonesien

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin Gießen

Dekan : Prof. Dr. M. Frimmer

Berichterstatter : Prof. Dr. H. Krauss

Tag der mündlichen Prüfung : 24. Mai 1974



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. E i n l e i t u n g	1
II. L i t e r a t u r	2
II.1. A l l g e m e i n e s ü b e r d a s T o l l w u t v i r u s	2
II.2 A l l g e m e i n e s ü b e r T o l l w u t i m p f s t o f f e	4
II.3. W i r k s a m k e i t s p r ü f u n g v o n T o l l w u t v a c c i n e n	16
II.4. E r f a h r u n g e n m i t d e m H a b e l - u n d d e m N . I . H . - T e s t	25
III. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	34
III.A. M a t e r i a l u n d M e t h o d i k	34
III.A.a. M a t e r i a l	34
III.A.b. M e t h o d i k	38
1. H a b e l - T e s t	38
2. N . I . H . - T e s t	40
3. A n t i k ö r p e r b i n d u n g s t e s t n a c h A R K O - W I K T O R - S I K E S	42
III.B. E r g e b n i s s e	44
III.B.1. H a b e l - T e s t s	44
III.B.2. N . I . H . - T e s t s	46
III.B.3. A n t i k ö r p e r b i n d u n g s t e s t n a c h A R K O - W I K T O R - S I K E S	49
IV. D i s k u s s i o n	55
V. Z u s a m m e n f a s s u n g	64
VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	67
VII. A n h a n g	92

Die Arbeit wurde zum Teil durch Mittel des
Sonderforschungsbereiches 47 (Virologie) finanziert.

I. Einleitung

Das Problem der Wirksamkeitsprüfung von Tollwut-Impfstoffen besteht, seit PASTEUR mit seinen Mitarbeitern CHAMBERLAND und ROUX in den Jahren 1880 bis 1884 erstmals ein Verfahren der aktiven Immunisierung gegen Tollwut erarbeitet hat.

Da es in der BRD bisher keine staatlichen Prüfungsvorschriften für Tollwutvaccinen gibt, wird die Prüfung der jeweiligen Vaccine beim Hersteller durchgeführt. Sie gliedert sich auf in Prüfungen auf Reinheit, Unschädlichkeit, Sicherheit und Wirksamkeit.

Für eine kurze Zeitspanne war nach dem 2. Weltkrieg (1949 - 1956) in Deutschland die Prüfungsmethode nach HEMPT zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutvaccinen staatlich vorgeschrieben (Hessisches Staatsministerium der Minister des Innern, Abt. V/Öffentliches Gesundheitswesen, V/Pharm., Tgb. Nr. 8689/49). Diese Methode hatte aber zuviele Nachteile, sodaß sie sich nicht durchsetzen konnte. Heute stehen für die Prüfung von inaktivierten Tollwutvaccinen auf ihre Wirksamkeit international gebräuchliche und von der WHO empfohlene Tests — speziell der Habel-Test und der N.I.H.-Test (National Institutes of Health) — zur Verfügung.

In der 3. Ausgabe der "Laboratory Techniques in Rabies" (1973) wird außerdem von R.J. ARKO, T.J. WIKTOR und R.K. SIKES eine neue Prüfungsmethode vorgestellt. Diese Methode reduziert den Arbeits- und Zeitaufwand — verglichen mit dem Habel und dem N.I.H.-Test — erheblich. Da bis jetzt kaum Erfahrungen mit diesem neuen Test vorliegen, wurde mir die Aufgabe gestellt, diese neue Methode zu erproben und mit dem Habel- und N.I.H.-Test zu vergleichen. Dabei sollte geprüft werden, ob sie als Ersatz für den Habel- und den N.I.H.-Test in Frage kommt.

II. L i t e r a t u r

II. 1. Allgemeines über das Tollwutvirus

Das Tollwutvirus wird seit 1966 zur RHABDO-virus-Gruppe gezählt (MELNICK und Mc COMBS). Es handelt sich bei den Rhabdo-Viren um "bullet - shaped" oder geschossförmige Viren, die RNS enthalten und gegen Lipidlösungsmittel empfindlich sind (KISSLING und REESE 1963 ; KAPLAN et al.1966).

SHOPE et al. (1970) ordneten das Tollwutvirus mit zwei weiteren Rhabdo-Viren (Iagos Bat Virus und Mokola Virus) aufgrund des gleichen RNP-Antigens in eine Subgruppe ein.

Die Viruspartikel sind etwa 125 - 240 nm lang und 75 - 80 nm breit. Längere Formen bis zu 300 nm und darüber sind insbesondere bei der "Straßenvariante" des Tollwutvirus beschrieben worden (MIYAMOTO und MATSUMOTO 1967 ; CAMPBELL et al.1968 ; SOKOL et al.1968).

Die Hülle des Tollwutvirus ist eine lipoproteinhaltige Doppelmembran, deren äußere Lamelle 6 - 10 Å lange Protrusionen trägt, die distal eine knopfähnliche Struktur tragen. Als Innenkomponente enthält das Viruspartikel ein Spiralförmig eingerolltes Nukleokapsid, ein Ribonukleoprotein.

Es handelt sich um eine rechtsgewundene, helikale, einsträngige Struktur mit einem Durchmesser von 10 nm und einer Länge von 1200 nm. Im gestreckten Zustand erreicht der Ribonukleoproteinstrang eine Länge von 4200 nm und zeigt einen abgeflachten Querschnitt mit einer Breite von 2 bzw. 6 nm (HUMMELER et al.1968 ; SOKOL et al.1969).

Das RNP- Antigen ist ein gruppenspezifisches Antigen für Tollwut und Tollwut-verwandte Viren (SCHNEIDER 1972 ;SCHNEIDER et al.1973).

Zwischen den einzelnen fixierten Stämmen des Tollwutvirus (z.B. FLURY - HEP , CVS , PITMAN MOORE) konnten bei Verwendung stammspezifischer Antiseren gewisse Antigendifferenzen nachgewiesen werden (KUWERT und WIKTOR 1968 ;WIKTOR und CLARK 1973). SCHNEIDER et al.(1973) stellten fest,daß für den Serotyp das Hüll - Antigen verantwortlich ist.Nach NEURATH et al.(1972) und WIKTOR et al.(1973) wird die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern nur vom Hüll - Glykoprotein induziert.

Wichtig ist, daß fixierte Stämme gewisse Differenzen aufweisen, die für die Vaccineherstellung von Bedeutung sind und sich auf Immunogenität, Widerstandsfähigkeit bei der Inaktivierung mit Phenol, Äther, Glyzerin und Trocknung beziehen (CAMPBELL et al.1968 ; KUWERT 1970 ; CLARK und WIKTOR 1970).

Derartige Unterschiede müssen bei der Impfstoffherstellung beachtet werden.

Das Tollwutvirus erwies sich allgemein als sehr potentes Antigen.

II. 2. Allgemeines über Tollwutimpfstoffe

Eine aktive Immunisierung gegen Tollwut beim Menschen wurde erstmalig von LOUIS PASTEUR durchgeführt. Er behandelte am 6. Juli 1885 den 9-jährige Joseph Meister, der 2 Tage vorher von einem tollwütigen Hund gebissen worden war. Er bekam 13 Injektionen mit einer 14 Tage lang getrockneten Rückenmarkssuspension von Kaninchen, die mit Virus fixe infiziert waren.

Heute kennt man über 50 verschiedene Methoden bzw. Modifikationen des Original - Pasteur - Impfstoffes. Ziel aller Methoden ist die Steigerung der spezifischen Wirkung, Immunogenität, Unschädlichkeit und guten Konservierungsfähigkeit bei gleichzeitiger Ausschaltung unspezifischer Reaktivität (EICHWALD und PITZSCHKE 1967).

Im Gegensatz zu den üblichen Impfverfahren bei anderen Infektionskrankheiten erfolgt die aktive Immunisierung gegen Tollwut beim Menschen in der Regel postinfektionell. Wegen der meist langen Inkubationszeit ist es möglich, durch eine postinfektionelle aktive Immunisierung eine Immunität gegen die in der Inkubation befindliche Erkrankung zu erzeugen, sodaß diese nicht zur klinischen Manifestation kommen kann.

Bekannte Gehirngewebevaccinen auf der Basis des Pasteur'schen Impfstoffes sind z.B.:

die Semple-Vaccine (1911), eine Phenol-inaktivierte Vaccine, ist die insgesamt am häufigsten verwendete Vaccine; die Fermi-Vaccine (1908), eine phenolisierte Vaccine, die noch eine Restmenge an Virus fixe enthält; die Hempt-Vaccine (1925), ein mit Äther extrahierter und Phenol-inaktivierter Impfstoff. Er wird in Jugoslawien, Ungarn und auch noch in den deutschsprachigen Ländern verwendet.

Die Gehirngewebevaccinen haben ihren immunisierenden Effekt bei Mensch und Tier unter Beweis gestellt, jedoch wird der Wert solcher Impfstoffe durch die Gefahr neurologischer Komplikationen zum Teil erheblich eingeschränkt. Diese enden zwar selten letal, können aber mit Dauerschäden verbunden sein (JANSSEN 1970; LINZENMEIER und KUWERT 1970).

Die Häufigkeit postvakzineller Schäden nach Anwendung derartiger Impfstoffe, die als Immunencephalitis, Immunmyelitis oder Immunneuritis auftreten, liegen nach älteren Angaben in einer Größenordnung zwischen 1 : 500 bis 1 : 5000. Nach KUWERT et al. 1972 sowie LINZENMEIER und KUWERT 1970 betrug in der Bundesrepublik die Rate schwerer Neurokomplikationen bei der Hempt-Vaccine 1 : 1765.

Das auslösende Prinzip stellt ein als Allergen wirkender, an das Myelin des Zentralnervensystems gebundener " Paralysefaktor " dar.

Das Auftreten von Komplikationen bei der antirabischen Behandlung mit Gehirngewebevaccine war von jeher ein Antrieb für die Forschung, eine verbesserte Vaccine zu entwickeln. Folgende Wege wurden dabei beschriftet:

1. Das Tollwutvirus wurde an verschiedene neue Wirte adaptiert. Dadurch wurden attenuierte Viren für Lebendvirusvaccinen bei Tieren gewonnen, die eine einmalige Vakzination erlaubten.
2. Tollwutvirus wurde in Gewebe vermehrt, das nur wenig oder keine encephalitogenen Substanzen enthält; z.B. in Gehirnen von neugeborenen Tieren oder Kulturen. Die auf diese Weise gewonnenen inaktivierten Vaccinen waren weitgehend frei von Nebenwirkungen.
3. Auf konventionelle Weise über Zentralnervengewebe von erwachsene Säugetieren vermehrtes Virus wurde gereinigt und dadurch die encephalitogenen Substanzen weitgehend entfernt (BELL et al. 1949).

Vaccinen des ersten Typs sind zum Beispiel Hühnerembryovaccinen mit den Stämmen FLURY oder KELEV.

Das FLURY - VIRUS ist nach 136 Gehirnpassagen über Eintagsküken und nach 40 - 50 Hühnerembryopassagen (low egg passage = LEP) in seiner Pathogenität für Hamster und Meerschweinchen abgeschwächt; es ist bei peripherer Applikation apathogen für Kaninchen und Hunde.

Die Hundevakzination mit der FLURY - LEP - VACCINE führte in den USA zu einer drastischen Verminderung der Tollwut-

erkrankungen beim Menschen. Nachteilige Auswirkungen auf den Menschen, etwa in dem Sinne, daß geimpfte Hunde Impfvirus auf Menschen übertragen hätten, wurden nicht bekannt (WACHENDÖRFER 1970; MAYR et al. 1973).

Das FLURY - VIRUS aus der 176. - 190.Hühnerembryopassage (high egg passage = HEP) war selbst nach intracerebraler Infektion für den Hund nicht mehr pathogen (KOPROWSKI et al.1954). Außerdem war dieses Virus für Menschen nicht mehr virulent (SCHWAB et al.1954). Das Virus kann bei Hunden und Katzen mit jährlicher Nachimpfung als Lebendvaccine angewendet werden.

Mit dem aus Israel stammenden, avianisierten KELEV - STAMM wurde nach 60 - 70 Passagen eine Vaccine für Rinder hergestellt; sie entspricht in ihren Eigenschaften etwa der der FLURY - HEP - VACCINE und findet entsprechende Verwendung.

Der erste entscheidende Schritt zur Gewinnung sogenannter "allergenfreier" inaktivierter Tollwutvaccinen waren Versuche von KABAT et al.(1947,1948), aus denen hervorging, daß bei Affen nach Applikation von fetalem Kaninchengehirn eine allergische Encephalomyelitis ausblieb. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, daß das als Allergen wirkende Myelin im fetalen Zentralnervensystem nicht präformiert ist, es wird erst mehrere Tage post partum aufgebaut.

In Gehirngewebe neugeborener Tiere vermehrt sich Tollwutvirus zu einem sehr hohen Titer, sodaß daraus eine Vaccine

von guter Immunogenität hergestellt werden kann (KAPLAN 1969). Seit Mitte der fünfziger Jahre werden Impfstoffe mit hohem Gehalt an virusspezifischem Antigen aus Gehirngewebe neugeborener Mäuse (FUENZALIDA und PALACIOS 1955; FUENZALIDA et al. 1964, 1965; SIKES und LARGHI 1967; LARGHI und FUENZALIDA 1972), neugeborener Ratten (SVET-MOLDAVSKIJ et al. 1965), sowie neugeborener Kaninchen (GISPEN und SAATHOF 1965; GISPEN et al. 1965) hergestellt.

Die Baby - Mäusegehirnvaccine wurde in Rußland (SVET-MOLDAVSKIJ et al. 1965) und Chile (FUENZALIDA et al. 1964) in ausgedehntem Maße angewendet. In Südamerika soll es nach unzureichender Inaktivierung des Virus zu Fällen von Impftollwut gekommen sein (WACHENDÖRFER 1970). Für den hohen Virusgehalt dieser Vaccine war möglicherweise die tolerierbare Konzentration des Inaktivierungsmittels zu gering, um eine völlige Inaktivierung zu gewährleisten. Außerdem verursachte eine Baby - Mäusegehirnvaccine bei 8 von 31 geimpften Personen lokale Reaktionen (SIKES und LARGHI 1967). Im Hinblick auf diese Befunde und auf die Möglichkeit der Verunreinigung solcher Gehirnvaccinen mit Proteinen abgetöteter Bakterien oder mit Viren (z.B. Leukose oder LCM - Virus der Maus) sowie im Hinblick auf den hohen Kostenaufwand erscheint es daher sehr fraglich, ob eine Massenproduktion derartiger Tollwutimpfstoffe für Mensch und Tier empfehlenswert ist (TURNER 1969; WACHENDÖRFER 1970).

SIKES und LARGHI (1967) entwickelten deshalb eine gereinigte Tollwutvaccine (purified rabies vaccine = PRV). Die Trennung des Tollwutantigens von Baby - Mäusehirngewebe erreichten sie durch Ultrazentrifugation und chromatographische Technik.

Die Vaccine war im Habel- und N.I.H.-Test wirksamer als eine Entenembryovaccine (duck embryo vaccine = DEV) und eine Nervengewebevaccine.

TURNER und KAPLAN (1967) trennten das Tollwutvirus von Gehirngewebe durch Emulgierung der Gehirngewebesuspension mit Trifluorotrichloräthan (Frigen).

Die mit der Anwendung der konventionellen Nervengewebevaccinen und den Baby - Gehirnvaccinen verbundenen Nachteile entfallen in der Regel bei Tollwutimpfstoffen, die über das Brutei oder über Gewebekulturen gewonnen werden. Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, daß beim Einsatz derartiger Impfstoffe einerseits die Gefahr der Neuroallergie weitgehend eliminiert (GIBBS et al.1961; TIMM und WOLTER 1970), andererseits die virusspezifische Antigenität insbesondere bei Gewebekulturvaccinen (WIKTOR et al.1969; SIKES et al.1971) wesentlich gesteigert ist.

KUWERT et al.(1972),MATHISON (1972),RUBIN et al.(1973), MOZAR et al.(1973),RAUCHENBERGER (1973) empfahlen die 1955 von PECK, POWELL und CULBERTSON entwickelte Entenembryovaccine als Zwischenlösung bis zur praxisreifen Entwick-

lung eines konzentrierten und gereinigten Virusimpfstoffes auf Gewebekulturbasis. Nach KUWERT et al.(1972) liegt die Neurokomplikationsrate der Entenembryovaccine um den Faktor 25 - 100 niedriger als bei der Hempt-Vaccine.

Nachteil der Entenembryovaccine ist in erster Linie ihre geringe Immunogenität (DEAN und SHERMAN 1962, HILDRETH 1963, HILDRETH 1966, KOPROWSKI 1966, TURNER 1969, STILLE und HELM 1969, CRICK und BROWN 1970, PLOTKIN und CLARK 1972, ELLENBOGEN und SLUGG 1973, CRICK 1973).

Um eine entsprechende Antikörperbildung zu bekommen, sind mehrmalige Injektionen notwendig. Diese stellen eine erhebliche Belastung für die Patienten dar.

Die Titer neutralisierender Antikörper sind trotz wiederholter Injektionen oft sehr niedrig.

Häufig treten auch lokale Reaktionen an der Injektionsstelle auf (WIKTOR et al.1973).

Als großer Fortschritt ist die Adaptation von Tollwutvirus an nicht nervengewebehaltige Zellkulturen (VIEUCHANGE et al. 1956) und die Entwicklung gereinigter und konzentrierter Zellkultur-Vaccinen zu werten (SOKOL et al. 1968).

Nachdem die Züchtung von Virus fixe und Straßenvirus in Hamsternierenzellen gelungen war (KISSLING 1958), wurden Vaccinen mit verschiedenen Tollwutstämmen aus Zellkulturen erzeugt.

Folgende Zellen wurden verwendet:

Hamsternierenzellen (FENJE 1960; KISSLING und REESE 1963;
OTT und HEYKE 1962; SELIMOV et al. 1963
OTT 1966; FENJE und PINTERIC 1966; LANG
et al. 1967; CHAPMAN et al. 1973)

Schweinenierenzellen: " ERA " - VIRUSSTAMM = EVELYN -
ROCKITNICKI - ABELSETH (ABELSETH 1964,
1965, 1967; LAWSON et al. 1967; LAWSON
und CRAWLEY 1971)

Hühnerembryofibroblasten: FLURY - LEP - VIRUS (CABASSO et al.
1956, 1966)

Hundenierenzellen: (BROWN et al. 1967, 1968)

NIL - Zellen = Baby - Hamster - Zellstamm (LANG 1967;
PETERMANN et al. 1967, 1969)

Diploider Zellstamm WI 38 vom Menschen (WIKTOR et al. 1964;
WIKTOR und KOPROWSKI 1965; KOPROWSKI
1966; PETERMANN 1969)

Patas - Affennierenzellen (PETERMANN 1969)

Es gelang sogar, Tollwutvirus an Reptilienzellkulturen zu adaptieren. Das Virus war nach 81 Passagen für adulte Mäuse apathogen, besaß aber immer noch eine gute Immunogenität (CLARK 1972; ATANASIU et al. 1973).

SIKES et al. (1971) vermehrten zellkulturadaptiertes
PITMAN MOORE - VIRUS (" PM STAMM ") in BHK - 21
(BABYHAMSTERNIEREN) - Einschichtzellkulturen, konzentrier-
ten danach das Virus mittels Ultrafiltration und Zentrifu-

gation und inaktivierten anschließend mit β - Propiolakton. Sie konnten mit dieser Vaccine mit einer einmaligen Impfung, die 4-6 Stunden nach der Infektion mit Straßenvirus erfolgte, 7 von 8 Rhesusaffen vor einer Erkrankung schützen.

Als Ziel für die Immunprophylaxe des Menschen gegen Tollwut muß die Herstellung einer absolut ungefährlichen, hochgereinigten und hochpotenten Tollwut - Spaltvaccine angestrebt werden, die nur für die Immunität verantwortliche Strukturanteile des Virus enthält, im übrigen aber vollkommen frei von anderen Bestandteilen, insbesondere frei von viraler und zellulärer Nukleinsäure ist (SOKOL et al. 1968; WIKTOR et al. 1969; CRICK und BROWN 1969; HUMMELER und KOPROWSKI 1969; SCHLUMBERGER et al. 1970; CRICK et al. 1970; SOKOL et al. 1971; SCHNEIDER et al. 1971, 1971; SCHNEIDER 1972; SIKES und LARGHI 1967; NEURATH et al. 1973; CRICK 1973).

Solche hochpotenten Vaccinen wären besonders bei der kombinierten Behandlung mit Hyperimmunserum von Bedeutung, da hierbei nur eine Vaccine mit sehr guter Wirksamkeit appliziert werden sollte (WIKTOR et al. 1971).

Ausgehend von Gewebekulturvirus konnten von der Arbeitsgruppe um KOPROWSKI am WISTAR - INSTITUT in PHILADELPHIA, USA zwei prinzipiell verschiedene Impfstoffe erzeugt werden (STECK 1971).

Es handelt sich dabei:

1. um eine Suspension von Tollwutviruspartikeln, durch Ultrazentrifugation oder Zinkacetatpräzipitation konzentriert auf 10^9 infektiöse Einheiten /ml und inaktiviert durch β -Propiolakton (SOKOL et al.1968), mit max. 5% Wirtsmaterial (nach KUWERT 1969 beträgt in Gehirngewebevaccinen das Verhältnis Wirtsgewebeantigen : Virusantigen etwa $10^9 : 1$!).
2. um eine virusfreie Spaltvaccine, bestehend aus Tollwutantigenen, die durch Druckdialyse konzentriert wurden (CRICK und BROWN 1969; SCHLUMBERGER et al.1970).

Beide Vaccinetypen besaßen im Vergleich zu der Semple-Vaccine um 20-40fach erhöhte Antigenitätswerte im N.I.H.-Test.

SCHNEIDER et al.(1971) spalteten Tollwutvirus mit Saponin, das in einer Konzentration von 1 mg / ml nicht nur das Virus in Membran- und Nukleoproteinanteile zerlegte, sondern darüber hinaus als bisher einzig bekanntes Detergenz die hämagglutinierenden Eigenschaften der Tollwutvirusmembran nicht nur konservierte, sondern sogar steigerte.

Durch weitere Aufarbeitung dieser Präparation wurde eine Spaltvaccine hergestellt, die im N.I.H.-Test nahezu die gleiche immunogene Wirkung besaß wie eine Virion-Vaccine.

Es wurden verschiedene Inaktivierungsverfahren für die Vaccine-Herstellung entwickelt. Die wichtigsten sind: Behandlung mit Phenol, Äther, Formalin, β -Propiolakton (BPL), UV-Strahlung, bzw. Wärmeinaktivierung.

Nach Untersuchungen von WIKTOR et al.(1972) ist eine BPL-inaktivierte Zellkulturvaccine zweifach potenter als eine mit UV-Strahlen inaktivierte Vaccine.

CRICK und BROWN (1969) erprobten Acethyläthylenimin (AEI) für die Virusinaktivierung. Mit dieser Substanz wurde die Virusproteinhülle nur minimal geschädigt.

WIKTOR et al.(1972) berichteten über die Vorteile von Gamma-Strahlen für die Virusinaktivierung. Die mit Gamma-Strahlen hergestellten Vaccinen waren im N.I.H.-Test potenter als BPL- und AEI- inaktivierte Vaccinen, außerdem ist das Durchdringungsvermögen der Gamma-Strahlen stärker als das von UV-Strahlen; damit besteht die Möglichkeit, größere Volumen zu behandeln.

In letzter Zeit bemühte man sich, die verschiedenen Vaccinen zu lyophilisieren, um eine Stabilisierung der biologischen Eigenschaften und eine Verlängerung der Verwendbarkeit zu erreichen (PECK et al.1955; SELIMOV et al. 1960; VEERARAGHAVAN und SUBRAHMANYAN 1961; SELIMOV 1968).

JAEGER und BARTH (1968) entwickelten eine Methode zur Herstellung einer inaktivierten Nervengewebevaccine in lyophilisierter Form, die selbst extremen Temperaturbelastungen gewachsen war. Während eines Zeitraums von 12 Monaten wurde bei der bei +56°C gelagerten Vaccine kein Abfall der Antigenität beobachtet. Erst nach einer Lagerzeit von

15 Monaten bei 56°C war die Wirksamkeit des Impfstoffes unter den im Habel-Test geforderten Mindestwert gesunken.

Ein Zusatz von 10 µg Poly A : U (Polyadenylic : Polyuridylic Complex) zu jeder Vaccinedosis erhöhte die Wirksamkeit einer inaktivierten Tollwutvaccine im N.I.H.-Test; damit ergab sich die Möglichkeit der Verwendung von Poly A : U als Adjuvans bei Tollwutvaccinen (BRANCHE und RENOUX 1972).

FENJE und POSTIC (1970,1971); JANIS und HABEL (1972) infizierten Kaninchen mit Tollwutstraßenvirus; danach injizierten sie den Interferoninduktor Polyribonucleosinic-Polyribocytidylic Acid (Poly I : C).

Sie konnten damit die Tiere vor einer Tollwuterkrankung schützen.

II. 3. Wirksamkeitsprüfung von Tollwutvaccinen

Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutvaccinen werden je nach Art der Vaccine verschiedene Methoden verwendet:

1. indirekte Methoden

a. Inaktivierte Tollwutvaccinen

- Habel-Test
- N.I.H.-Test
- Modifizierter Habel-Test
- Meerschweinchen-Test (Guinea Pig Potency Test)
- Antikörperbindungstest nach ARKO-WIKTOR-SIKES

b. Tollwut-Lebendvaccinen

- Meerschweinchen-Test (Guinea Pig Potency Test)
- NYLAR (New York Laboratories and Research) -Test
- Mäuse-Test (Mouse Titration) der Veterinary
Biologics Division, United States
Department of Agriculture (U.S.D.A.),
Agricultural Research Service.

2. direkte Methoden

- Belastungsinfektionstest mit der Spezies, in dem die Vaccine in der Praxis verwendet wird (ad us. vet.)
- Ermittlung der neutralisierenden Antikörper nach Verabreichung der Vaccine (ad us.hum./ ad us.vet.)

Der Habel-Test.

WEBSTER (1939) stellte fest, daß bestimmte Inzuchtstämme weißer Mäuse, z.B. W-Swiss-Mäuse, für intracerebral und

intramuskulär verabreichtes Tollwutvirus — im Gegensatz zu Kaninchen und Meerschweinchen — eine besonders hohe und gleichmäßige Empfindlichkeit aufweisen. Er konnte außerdem solche Mäuse intraperitoneal leicht und regelmäßig innerhalb von 10 Tagen immunisieren.

Die immunisierten Mäuse wurden in Gruppen eingeteilt und durch eine Belastungsinfektion mit verschiedenen Virusverdünnung auf ihre Immunität überprüft.

WEBSTER hob besonders hervor, daß mit Handelsimpfstoffen, die noch lebendes Virus enthielten, ein wesentlich besseres Ergebnis erzielt wurde als mit völlig inaktivierten Impfstoffen, die erst nach mehrmaliger intraperitonealer Gabe (6 Injektionen) eine Immunität hervorriefen.

Der von WEBSTER unter Verwendung von W-Swiss-Mäusen eingeführte MÄUSETEST wurde von WYCKOFF und BECK (1940) noch vereinfacht und zeitlich abgekürzt. Von HABEL (1940) wurde der von WEBSTER beschriebene Mäusetest nochmals eingehend auf alle jene Faktoren untersucht, die seine Reproduzierbarkeit beeinflussen. HABEL versuchte, eine weitgehende Standardisierung des Testes zu erreichen. In den folgenden Jahren erfuhr die nun "HABEL-TEST" genannte Methode, die eigentlich nach WEBSTER (1939) benannt werden müßte, noch geringgradige Abänderungen.

Auf all diesen Erfahrungen aufbauend, wurden von den U.S. National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, bereits 1946 Mindestanforderungen für Tollwutimpfstoffe ausgearbeitet und der Habel-Test als Teil der Impfstoffprü-

fung für Tollwutvaccinen ad us.hum. in den U.S.A. vorgeschrieben. Der Habel-Test wurde schließlich 1950 auch von der WHO empfohlen.

Der N.I.H.-Test wurde zum erstenmal im Februar 1953 in den " U.S.Minimum Requirements for Rabies Vaccine " des N.I.H. beschrieben und 1954 von der WHO neben dem Habel-Test für die Prüfung von inaktivierten Tollwutvaccinen empfohlen.

Auch beim N.I.H.-Test werden Mäusegruppen immunisiert, die nach einer bestimmten Zeit mit Tollwutvirus belastet werden. Während beim Habel-Test diese mit einer einheitlichen Vaccineverdünnung immunisiert und mit verschiedenen Viruskonzentration infiziert werden, geschieht die Immunisierung der Mäusegruppen beim N.I.H.-Test mit verschiedenen Vaccineverdünnungen und die Infektion mit einer einheitlichen, auf eine bestimmte Viruskonzentration eingestellten Virus-suspension.

Beim N.I.H.-Test wird im Gegensatz zum Habel-Test eine Standardvaccine mitgeprüft.

Der modifizierte Habel-Test wurde von der WHO 1966 empfohlen und ist vor allem für Laboratorien geeignet, die nicht genügend Mäuse zur Verfügung haben. Hier werden 5 Mäuse — anstelle von 10 Mäusen im echten Habel-Test — in einer Gruppe verwendet. Dadurch wird die Gesamtzahl um mindestens 56% verringert. Die Mäuse werden genauso wie im Habel-Test vacciniert. Am 14.Tag nach der 1.Impfung

werden alle vaccinierten Mäuse mit 500, besser 1000 LD₅₀ (BARTH und JAEGER 1968) intracerebral infiziert.

Bei einer guten Vaccine überleben mindestens 50% der vaccinierten Mäuse. Der Test ist nicht quantitativ und trennt nur Vaccinen mit geringer Wirksamkeit von qualitativ hochwertigen. In bestimmten Zeitintervallen sollten auf diese Weise geprüfte Vaccinen auch im Habel-Test oder N.I.H.-Test geprüft werden.

Der Meerschweinchen - Test (KOPROWSKI 1954) wurde ursprünglich zur Prüfung von Hühnerembryo-Lebendvaccinen entwickelt und von der WHO zur Prüfung von Lebendvaccinen empfohlen. Mindestens 10 Meerschweinchen werden mit verdünnter Vaccine geimpft und nach 3 Wochen mit Straßenvirus oder Virus fixe infiziert.

Die Vaccine wird so verdünnt, daß noch 5% Gewebe enthalten ist. Bei der Belastungsinfektion werden mindestens 5 Kontrolltiere mit injiziert. Die Beobachtung dauert 14 Tage bei Verwendung von Virus fixe als Belastungsvirus und 21 Tage bei Verwendung von Straßenvirus. Es ist erforderlich, daß 80% der Kontrolltiere tollwutpositiv sind und 70%, jedoch nicht weniger als 7 der vaccinierten Meerschweinchen überleben. Der Test wurde schließlich vom United States Department of Agriculture (1968, 1972, 1973) auch zur Prüfung von inaktivierten Tollwutvirus-Vaccinen ad us. vet. neben dem N.I.H.-Test angewendet. In diesem Falle wird der Test genauso wie bei der Prüfung von Lebendvaccinen

durchgeführt, wobei als Impfdosis für die Meerschweinchen 1/5 der für Hunde empfohlenen Dosis verwendet wird.

Der Antikörperbindungstest nach ARKO - WIKTOR - SIKES.

In der 3. Ausgabe der " Laboratory Techniques in Rabies " (1973) wurde von ARKO, WIKTOR und SIKES eine neue Methode zur Prüfung von inaktivierten Vaccinen vorgestellt. Da der N.I.H.-Test zur Bestimmung der Antigenitätswerte von Zellkultur-Vaccinen, gereinigten Vaccinen oder Vaccinen mit einer Gewebekonzentration von weniger als 10% relativ ungenau ist (ARKO et al.1970), wurde dieser neue Test besonders zur Prüfung von solchen modernen Vaccinen entwickelt.

Sowohl die Test- als auch eine Referenzvaccine werden titriert und die Verdünnungen mit einem Standard-Tollwut-immunserum inkubiert. Nicht adsorbierte Antikörper werden im Neutralisationstest ermittelt.

Es müssen mit diesem Test jedoch erst entsprechende Erfahrungen gesammelt werden, bevor er für die Routineanwendung empfohlen werden kann (KAPLAN 1973).

Der NYLAR - Test des New York Laboratories and Research Institute wird ähnlich dem N.I.H.-Test als " Antigenextinktionstest " durchgeführt. Die Mäuse werden nur einmal vacciniert, und die Infektion erfolgt i.m. 21 Tage nach der Impfung. Der Test wird jedoch seit 1973 von der WHO nicht mehr empfohlen.

Im MÄUSE - Test (U.S.D.A.) wird das Tollwut-Vaccinevirus in Mäusen titriert und somit der Virusgehalt der Vaccine bestimmt. Die Beobachtungszeit beträgt i.A. 14 Tage; beim ERA - Stamm 21 Tage. Eine befriedigende Vaccine sollte einen Titer von wenigstens $10^{3,3}$ LD₅₀ haben.

Bei dem Belastungsinfektionstest werden Tiere der Spezies, für die die Vaccine vorgesehen ist, vacciniert und nach einer bestimmten Zeit mit Straßenvirus infiziert.

Der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern nach Tollwutvakzinierung wird heute noch in der Regel mit dem Mäuseneutralisationstest (ATANASIU 1966, 1973) durchgeführt. Eine moderne Methode ist der von SEDWICK und WIKTOR 1967 entwickelte Plaque-Reduktionstest, der immer häufiger in der Tollwutforschung Anwendung findet, jedoch eines entsprechenden technischen Aufwandes bedarf. Im Test werden in der Regel der Gewebekultur-adaptierte CVS-Tollwutvirusstamm und die BHK-Zelllinie S 13 verwendet. Der Test dauert 6 Tage, gegenüber einer Dauer von 3 Wochen im Mäuseneutralisationstest (NT). Der Sephadex-Einschichtzellkultur-Plaquetest (SMP test = Sephadex monolayer plaque test) nach SCHNEIDER (1973) unterscheidet sich vom üblichen Plaque-Reduktionstest nur in technischen Einzelheiten und dauert ebenfalls 5-6 Tage.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Tollwut-Antikörpern ist der von SZIEGOLEIT und GERTH (1971) entwickelte Interferenz-Hemmungstest (interference inhibition test = IFIT). Der Test erscheint für die Routine etwas kompliziert, da außer Tollwutvirus noch ein Provokationsvirus (Semliki-Forest-Virus) benötigt wird. Der Test dauert etwa 5 Tage. Im Experiment ergab sich aber eine gute Korrelation zwischen Ergebnissen im Interferenz-Hemmungstest und dem Mäuseneutralisationstest. Es wurden sogar mit dem IFIT noch klare positive Ergebnisse erzielt, wenn die Ergebnisse im Neutralisationstest fraglich waren.

Von DEBBIE, ANDRULONIS und ABELSETH (1972) wurde die Fluoreszierende Antikörper-Technik in der Zellkultur (tissue culture-fluorescent antibody technique = TCFA) beschrieben. Die Fluoreszierende Antikörper-Technik ist empfindlicher und reproduzierbarer als der NT. Von den Verfassern wurde der ERA-Stamm verwendet, der jedoch als Testvirus noch keine breite Anwendung gefunden hat. Der Test dauert 5 Tage.

Auf der Grundlage der Fluoreszenz-Serologie basiert auch die "Schnelle Fluoreszierende Fokus-Hemmungs-Technik" (rapid fluorescent focus inhibition technique = RFFIT) nach SMITH, YAGER und BAER (1973). Die Methode ist sehr empfindlich, gut reproduzierbar und schnell (innerhalb von 24 Stunden) durchzuführen.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen Tollwutvirus ist die Passive Hämagglutinationsreaktion (rabies passive haemagglutination technique = RPHA) von GOUGH und DIERKS (1971). Mit der sehr empfindlichen Methode werden jedoch nicht die neutralisierenden Antikörper ermittelt (SMITH et al. 1973).

Der Plaque-Reduktions- sowie der SMP- Test, die RFFI- Technik und auch die Passive Hämagglutination wurden 1973 von der WHO für die Anwendung in Tollwutlaboratorien neben dem Mäuseneutralisationstest empfohlen.

Die Bedeutung humoraler Antikörper für den Schutz gegen eine Tollwuterkrankung wird zwar nicht einheitlich beurteilt (SCHINDLER 1963), doch liegt in der Ausbildung neutralisierender Antikörper bei geimpften Individuen die Grundlage zur objektiven Einschätzung der Antiginität einer Vaccine (ATANASIU et al. 1956, 1961, 1967 ; OTT und HEYKE 1962 ; WÖHLE 1965 ; HILDRETH 1966 ; BROWN et al. 1967 ; SOULEBOT et al. 1967 ; CRICK und BROWN 1969 ; TURNER 1969 ; KOPROWSKI 1970 ; SIKES 1970 ; ELLENBOGEN und SLUGG 1973 ; TURNER 1973).

Der Nachweis virusneutralisierender Antikörper im Serum ist demnach als Beweis für eine bestehende Immunität durchaus verwertbar, sofern der Zeitpunkt der Untersuchung richtig gewählt wird (KOPROWSKI et al. 1950 ; KUWERT und BINDRICH 1958 ; EICHWALD 1963 ; DEAN et al. 1964 ; DREESEN et al. 1970 ; SCHNEIDER 1972).

JOHNSON (1945), CABASSO (1966), LAWSON et al.(1967), EMERY et al.(1968) sowie BARTH und JAEGER (1970) stellten aber eine Resistenz gegen eine experimentelle Tollwut-Infektion auch bei serologisch negativen Impfungen fest. Bereits FOX, KOPROWSKI, CONWELL, BLACK und GEFLAND (1957) waren der Meinung, daß bei Abwesenheit von Tollwutvirusneutralisierenden Antikörpern nicht immer eine Infektionsschutz fehlt. NETTO et al.(1973) wiesen nach, daß der Immunstatus nicht allein durch das Messen von neutralisierenden Antikörpern im Serum bestimmt werden kann. Nach HABEL (1964) und STECK (1971) spielen neben zirkulierenden Antikörpern eine zelluläre Immunität, d.h. immunkompetente Zellen und deren Lokalisation im Organismus eine entscheidende Rolle für die Tollwutimmunität.

Untersuchungen von WIKTOR et al.(1972) sowie BAER und CLEARY (1972) ergaben, daß Tollwutvaccinen auch die Bildung von Interferon induzieren.

II. 4. Erfahrungen mit dem Habel- und dem N.I.H.-Test

Bei gleichzeitiger Anwendung der beiden Tests zur Prüfung einer Vaccine können unterschiedliche Ergebnisse auftreten. Es wurden deshalb bereits von HABEL und WRIGHT (1948) Faktoren, die Mäusetests bei der Impfstoffprüfung beeinflussen, untersucht. Geringgradige Unterschiede, die aber keine wesentliche Bedeutung hatten, wurden durch die persönliche Technik des einzelnen Untersuchers festgestellt. Größere Unterschiede in den Versuchsergebnissen, bei denen immer mit denselben Impfstoffchargen gearbeitet wurde, traten durch die Verwendung unterschiedlicher Virusstämme für die Belastungsinfektion auf. HABEL und WRIGHT hielten es daher für notwendig, die Infektion immer mit demselben Stamm vorzunehmen. Sie und andere Autoren wie MÖBEST (1958), DEAN und SHERMAN (1962), JAEGER und BARTH (1967) stellten außerdem fest, daß der verwendete Mäuse-Stamm und das Alter der Mäuse eine wichtige Rolle spielen.

In jährlichen Intervallen wird seit einiger Zeit von den National Institutes of Health ein Standard-Kontrollvirus (CVS) abgegeben, damit der Habel-Test in den verschiedenen Instituten mit dem gleichen Kontrollvirus durchgeführt werden kann und zumindest in dieser Beziehung eine gleichmäßige Beurteilung der Impfstoffe erfolgt.

In der Tab.1 ist die Häufigkeit der verwendeten Prüfungsmethoden für die Tollwutvaccinen ad us.hum. bis 1967 dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß der Habel-Test bis 1967 die gebräuchlichste Prüfmethode war.

Tabelle 1

Wirksamkeitsprüfungen von Tollwutvaccinen
ad us.hum. bis 1967 nach BARTH (1969)

Art der Prüfung	Anzahl der Hersteller	%
Habel-Test	34	64
N.I.H.-Test	10	19
Andere	4	7,5
Keine	5	9,5
Gesamtzahl	53	100

In 104 Veröffentlichungen, in denen über Wirksamkeitsprüfungen von Tollwutvaccinen berichtet wurde, beschrieben 59 Autoren Ergebnisse mit dem Habel-Test und 45 mit dem N.I.H.-Test. Untersuchungen nach 1970 wurden jedoch häufiger mit dem N.I.H.-Test durchgeführt als mit dem Habel-Test.

Über die Aussagekraft des Habel-Tests hinsichtlich des Schutzwertes inaktivierter Tollwutvaccinen gibt es unterschiedliche Meinungen.

HACKENTHAL (1955) berichtete, daß die Verwendung von Aqua dest. mit Zusatz von 2% Pferdeserum für die Virusverdünungen zu einer unspezifischen, aber erheblichen Steigerung der Virulenz des Virus bei den Kontrollmäusen führte, während dieser Effekt bei immunisierten Mäusen kaum in Erscheinung trat. Dadurch wurden die Immuntiter künstlich erhöht. Nach seiner Ansicht führt dies zu falschen Vorstellungen über die Wirksamkeit der Vaccine. Diese Verdünnungsflüssigkeit wird jedoch heute generell von der WHO empfohlen.

KRAUSE (1956) wies darauf hin, daß es bei den immunisierten Tiergruppen nach der Infektion häufig zu biphasischen Mortalitätskurven (" humpbacked curves") kommt, die eine Berechnung der Impfstoffwerte oft zu einem nicht zu lösenden mathematischen Problem werden lassen. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, daß vaccinierte Mäuse, die mit größeren Virusmengen infiziert werden, oft überleben.

Der von KRAUSE bemängelte biphasische Verlauf der Mortalitätskurven im Habel-Test wurde von MATEWA (1959), DEAN und SHERMAN (1962), DEAN et al.(1963), GLATHE (1966), JAEGER und BARTH (1967) und SOULEBOT et al.(1967) bestätigt.

KRAUSE schlägt daher statt des unnatürlichen intracerebralen Infektionsmodus die intraplantare Inokulation vor, bei der nur monophasisch verlaufende Mortalitätskurven zu erwarten sind.

MATEWA (1959) prüfte die Anwendungsmöglichkeit des " PLANTARTESTES " bei der Titrierung von Semple-Impfstoffen. Die dabei erzielten Ergebnisse waren zwar bei den einzelnen Impfstoffserien unterschiedlich, jedoch nicht so widerspruchsvoll wie bei den gleichzeitig durchgeführten Habel-Tests.

GLATHE (1966) untersuchte die Hempt-Vaccine im Habel- und im Plantar-Test nach KRAUSE. Die Ergebnisse zeigten, daß beide Prüfungsmethoden in sich gleichmäßige Resultate liefern. Er konnte jedoch den stark ausgeprägten biphasischen Kurvenverlauf nur im Habel-Test, nicht aber im Plantar-Test beobachten. Nach GLATHE kann daher die Anwendung des Plantar-Testes nach KRAUSE zur routinemäßigen Prüfung von Tollwutimpfstoffen nach HEMPT empfohlen werden.

MÖBEST (1958) prüfte ebenfalls die Verwendbarkeit des Habel-Tests zur Wirksamkeitsbestimmung von Hempt-Vaccinen. Dabei wurde der geforderte Mindestschutzwert von 10^3 nur unregelmäßig erreicht. Auf Grund seiner Untersuchungen maß MÖBEST dem numerischen Ergebnis des Wirksamkeitstests von Hempt-Vaccinen im Habel-Test nur wenig Bedeutung bei. MÖBEST, NIKOLITSCH (1958, 1964) und BÖHM (1962) fanden, daß der Habel-Test im Grunde genommen nur aussagt, ob eine ak-

tive antirabische Vaccine vorliegt, ohne daß man ihre Wirksamkeit exakt beurteilen kann.

Nach KAPLAN (1973) sollte man im Habel-Test und N.I.H.-Test erzielten Ergebnissen keine allzu große quantitative Bedeutung beimessen. Eine Vaccine, die z.B. im Habel-Test einen Schutzwert von 12000 hat, ist nicht 12 mal so wirksam wie eine Vaccine, die einen Schutzwert von 1000 hat. Beide Tests bestimmen mehr das Minimum als die absolute Wirksamkeit. Hohe Schutzwerte im Habel- oder N.I.H.-Test sind kein Anlaß, die Vaccine zu verdünnen oder die Dosierung zu vermindern.

ZUNKER und BULLING (1958) berichteten, daß Hempt-Vaccinen im Habel-Test völlig versagten. Als eine wesentliche Fehlerquelle des Tests wurde die ungewöhnliche große Dosis der sechsmaligen Impfungen beschrieben.

Bei Untersuchungen von ERCEGOVAC (1954) mit dem Habel-Test verendeten mehr vaccinierte als unvaccinierte Mäuse.

EISSNER (1954) konnte bei der Untersuchung von Hempt-Vaccinen keinen Wirksamkeitseffekt im Habel-Test nachweisen.

ALBRYCHT und WYSOKIŃSKA (1972) fanden keine Beziehung zwischen dem Schutzwert einer Semple-Vaccine im Habel-Test und den Antikörpertitern der geimpften Mäuse.

Nach JAEGER und BARTH (1967) sind als Fehlerquellen beim Habel-Test vor allem zu nennen:

- a. die unterschiedliche Immunisierbarkeit verschiedener Mäusestämme
- b. der unterschiedliche Ausfall der Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen mit derselben Vaccinecharge (ERCEGOVAC 1954; MÖBEST 1958; MATEWA 1958; NIKOLITSCH 1964; LAVENDER und VAN FRANK 1971; ALBRYCHT und WYSOKIŃSKA 1972)
- c. die von dem natürlichen Infektionsweg abweichende Methode der intracerebralen Testinfektion (ERCEGOVAC 1954; KRAUSE 1956; SELIMOV und KLJUEVA 1969)
- d. das aufwendige Injektionsschema und die nicht unbe-trächtlichen Versuchstierkosten.

Die obengenannten Faktoren machen oft einen Vergleich von Vaccinen verschiedener Herstellungsweise oder verschiedener Hersteller schwierig. Mit dem Einsatz einer Standard-vaccine von bekannter Wirksamkeit können jedoch diese Fak-toren kontrolliert werden (ZUNKER und BULLING 1958).

RISLAKKI (1957) sowie BARTH und JAEGER (1969) stellten weiterhin fest, daß mit nur zwei, bzw. drei Injektionen innerhalb des beim Habel-Test vorgeschriebenen Impfzeit-raumes gleiche oder sogar höhere Schutzwerte als beim Standardtest erzielt wurden. Damit besteht die Möglich-

keit, dieses Prüfverfahren durch Verminderung der Zahl der Injektionen zu vereinfachen.

Nach BARTH (1967), JAEGER und BARTH (1967) sowie PETROVIĆ (1973) ist der Habel-Test unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien ein durchaus brauchbares Verfahren zur Prüfung von Tollwutvaccinen nach Hempt.

Für reproduzierbare Ergebnisse im Habel-Test müssen folgende Faktoren gegeben sein:

- a. ein einheitlicher, genügend untersuchter Mäusestamm von gleichbleibender Qualität,
- b. eine einwandfreie Unterbringung und Fütterung der Mäusegruppen,
- c. eine gut aufeinander eingespielte Arbeitsgruppe,
- d. die Verwendung von halbautomatischen Dosierungsspritzen für die i.p. Impfung und für die i.c. Infektion, und schließlich
- e. die Standardisierung und Vereinheitlichung sämtlicher Arbeitsvorgänge, angefangen von der Zubereitung der Impfstoffverdünnung für die Vaccination bis zur Auswertung der Ergebnisse.

Bis 1967 war es schwierig, die für den N.I.H.-Test notwendige Standardvaccine zur Verfügung zu stellen (WHO 1966). Dies hing mit den Schwierigkeiten bei der Herstellung von lange haltbaren Standardimpfstoffen von gleichbleibender

Wertigkeit zusammen (DEAN und SHERMAN 1962; STECK und SCHNEIDER 1963; KISSLING und REESE 1963; WHO Expert Committee on Biological Standardization 1964; sowie JAEGER und BARTH 1967, 1968).

Um hier Abhilfe zu schaffen, untersuchten JAEGER und BARTH (1968) eine aus einer homogenisierten, Virus fixe-haltigen Kaninchengehirn- und Rückenmarksuspension hergestellte, gefriergetrocknete und nach der Trocknung durch Wärme inaktivierte Tollwutvaccine auf ihre Eignung als Standardvaccine. Die Vaccine bestand in einer Verdünnung von 1 : 160 (0,0625% Gehirns substanz) noch nach 6 Monaten Lagerung bei +56°C und nach zweimonatiger Lagerung bei +70°C den Habel-Test.

Neben einer derartig stabilisierten Standard-Nervengewebe-Vaccine sollte in Zukunft auch eine zweite Standardvaccine — hergestellt aus Zellkulturen oder gereinigtem Virus — für die Prüfung von Vaccinen zur Verfügung stehen, die kein Nervengewebe enthalten (HABEL 1973).

SELIMOV und KLJUEVA (1969) modifizierten den N.I.H.-Test, wobei sie die Inokulation subcutan statt intracerebral mit Straßenvirus unternahmen. Im Gegensatz zum Virus fixe sind jedoch derartige Stämme nicht einheitlich genug. Außerdem sind bei subkutaner Inokulation höhere Virusdosen erforderlich.

Nach LAVENDER und VAN FRANK (1971) ist der N.I.H.-Test un-

geeignet zur Prüfung von Zellkulturvaccinen, die sehr wenig Protein enthalten. Sie prüften gereinigte Zellkulturvaccinen gleichzeitig im Habel- und N.I.H.-Test. Oft erreichten Vaccinen, die im N.I.H.-Test sehr niedrige Wirksamkeitswerte hatten, sehr hohe Schutzwerte im Habel-Test.

Nach LAVENDER (1973) kann eine Vaccine mit einem relativ niedrigen Antigenitätswert zwischen 0,20 bis 0,30 im N.I.H.-Test eine ebenso gute Antigenität haben und eine entsprechende Wirksamkeit beim Menschen aufweisen wie eine Vaccine mit einem Antigenitätswert von 1,0.

ARKO et al.(1970) berichteten über die Prüfungen von verschiedenen Vaccinen im N.I.H.-Test, die gleichzeitig im WISTAR INSTITUT, PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA und im CENTER FOR DISEASE CONTROL (C.D.C.) in ATLANTA, GEORGIA, durchgeführt wurden. Die von beiden Laboratorien erzielten Ergebnisse wiesen starke Differenzen auf. Die Schutzwerte unterschieden sich z.T. um den Faktor 2 - 8 .

Wegen der obligaten Mitführung eines Standard-Impfstoffes ist der N.I.H.-Test jedenfalls mehr standardisiert als der Habel-Test (HABEL 1973). In den " Standard Requirements " des United States Department of Agriculture ist deshalb für die Prüfung von inaktivierten Tollwutvaccinen seit 1.November 1972 heute nur noch der N.I.H.-Test vorgeschrieben.

III. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

III.A. Material und Methodik

III.A. a. Material

1. Tiermaterial

Es wurden insgesamt 6200, 12 - 15 g schwere NMRI- Mäuse verwendet, die aus der Zucht der Behringwerke (Marburg/L.) stammten.⁺

2. Standardvaccinen

a. N.I.H.Reference Rabies Vaccine Lot 176 und 180.

Es handelt sich um eine gefrier-getrocknete Nerven-gewebevaccine, die mit U.V.Strahlen inaktiviert und lyophilisiert von der Division of Biologics Standards des N.I.H., Bethesda, Maryland, U.S.A. zur Verfügung gestellt wurde.

Durch Auflösung in 8 ml Aqua dest. wurde vor der Verwendung — entsprechend der Vorschrift — von dieser Vaccine eine 10% ige Suspension hergestellt.

b. Substandardvaccine A 18 der Behringwerke Marburg/Lahn.

Diese Vaccine war aus einer homogenisierten, Virus fixe- haltigen Suspension von Kaninchengehirn und -rückenmark (Stamm Novi Sad) hergestellt, gefrier-getrocknet und nach der Trocknung durch Wärme inaktiviert worden.

Nach Auflösung in 7 ml Aqua dest. wurde diese Vaccine ebenfalls als eine 10% ige Suspension verwendet.

⁺ Ich danke den Behringwerken, insbesondere Herrn Prof.Dr.K.Dräger, sowie Herrn Dr.R.Barth und Herrn Dr.O.Jaeger für die jederzeit gewährte, großzügige Unterstützung.

3. Testvaccinen

- a. Tollwutvaccine nach Hempt (Behringwerke Marburg), Op.Nr.516, 520, 526, 534. Diese kommerzielle Vaccine wurde aus Gehirn von Kaninchen gewonnen, die mit Virus fixe, Stamm Novi Sad, infiziert worden waren. Der Impfstoff bestand aus einer 7% igen Suspension, die 5 mg Phenol/ ml enthielt.

b. Zellkultur-Vaccinen:

experimentelle Impfstoffe der Behringwerke, Marburg:

Vaccine HTW 35, HTW 36 und HTW 37.

Es handelt sich dabei um in Hühnerembryofibroblasten vermehrtes Tollwutvirus Flury - LEP unterschiedlicher Passagezahl, das mit β -Propiolakton (BPL; 1 : 4000) inaktiviert wurde.

Das Lösungsmittel für die Impfstoffe enthielt 10% Aluminiumhydroxyd als Adjuvans.

Vaccine GTW 133 a, GTW 134 a, GTW 54 a und GTW 56 a.

Diese lyophilisierten, durch Wärme inaktivierten Tollwutvaccinen wurde aus einem in Hühnerembryofibroblasten vermehrten, zellkulturadaptierten Tollwutvirusstamm Flury-LEP mit unterschiedlicher Passagezahl hergestellt. Die beiden Vaccinen GTW 54 a und 56 a waren identisch. Sie wurden mit Virus derselben Passage auf gleiche Weise hergestellt.

Das Lösungsmittel für die Impfstoffe enthielt ebenfalls Aluminiumhydroxyd als Adjuvans.

4. Tollwut-Antiserum

Tollwut-Immunserum W.S. - 1 (Behringwerke Marburg/Lahn).
Das Serum wurde entsprechend der Vorschrift so verdünnt,
daß in 1 ml 0,1 internationale Einheiten (I.U.) enthal-
ten waren.

5. Virusverdünnungslösung

Es wurde 2% inaktiviertes Pferdeserum in Aqua dest. ver-
wendet.

6. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

PBS wurde nach dem Angaben von DULBECCO und VOGT (1957)
hergestellt.

7. Tollwutvirus

Virus fixe der Stämme CVS - 27, Ib 5 und CVS - 27, Ib 6
(CVS = Challenge Virus Standard) wurde von den Behring-
werken zur Verfügung gestellt.

Tollwutvirusvermehrung

Eine 40% ige Gehirnsuspension von tollwutkranken Mäusen
wurde mit Virusverdünnungslösung hundertfach verdünnt.
Mit 0,03 ml dieser Virusverdünnung wurden je 120 Mäuse
intracerebral infiziert. 5 Tage p.i. wurden die an Toll-
wut erkrankten Mäuse mit Äther getötet und die Gehirne
entnommen. Die Gehirne wurden homogenisiert und mit Virus-

verdünnungslösung auf eine 40% ige Suspension verdünnt.
Nach Zentrifugation bei 3000 Upm. für 15 Min. wurde der
Überstand in Portionen zu 0,5 ml aufgeteilt und bei
- 70°C gelagert.

Nach 3 Wochen Lagerung wurde eine Virustitration in 6
Wochen alten Mäusen durchgeführt.

III.A. b. Methodik

1. Habel-Test

Mäusegruppen wurden mit einer einheitlichen Vaccine-verdünnung immunisiert und anschließend mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert.

Immunisierung

Die zu immunisierenden Mäuse wurden in 5 Gruppen zu je 10 Tieren aufgeteilt, desgleichen die Kontrolltiere in 4 Gruppen zu gleichfalls je 10.

Die Immunisierung der ersten Gruppe erfolgte intraperitoneal am Montag, Mittwoch und Freitag an zwei aufeinanderfolgenden Wochen mit je 0,25 ml einer einheitlichen Verdünnung der Vaccine, insgesamt also 6 Injektionen pro Tier.

Die zu prüfenden Nervengewebevaccine wurden so verdünnt, daß sie 0,5% Gehirnssubstanz enthielten. Die Hempt-Vaccine wurde deshalb im Verhältnis 1 : 14 verdünnt (die Original-Hempt-Vaccine wird 1 : 20 verdünnt).

Die lyophilisierten Zellkultur-Vaccinen wurden zuerst in 2 ml Al(OH)_3 - Lösung aufgelöst und danach 1 : 20 verdünnt.

Testinfektion der Mäuse

14 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die vaccinierten Mäuse mit 0,03 ml Virus fixe, Stamm CVS, infiziert. Die geimpften Mäusegruppen wurden

mit den Virusverdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} , die Kontrollgruppen mit den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} infiziert. Die Virusverdünnungen wurden bis zur Infektion in einem Eiswasserbad gehalten.

Bei der Infektion der Tiere wurde stets mit der höchsten Verdünnung begonnen.

Die LD_{50} lag — entsprechend einer Empfehlung der WHO — nicht unter 10^{-5} .

Beobachtung

Die Mäuse wurden bis 14 Tage p.i. täglich kontrolliert. Alle Tiere, die innerhalb der ersten 5 Tage nach der Infektion starben, blieben bei der Berechnung unberücksichtigt, da hier in der Regel andere Ursachen als eine Tollwuterkrankungen vorlagen. Alle Mäuse, die nach dem 6.Tag p.i. verendeten sowie diejenigen, die Paralysen, Konvulsionen, Koordinations- oder Gleichgewichtsstörungen aufwiesen, wurden als Tollwut-positiv bewertet.

Die Berechnung des Schutzwertes

Diese erfolgte nach der Methode von REED und MUENCH nach dem Prinzip der Subtotalisierung. Für die vaccinierten Tiere und die Kontrollgruppen wurde zunächst die LD_{50} ermittelt. Der log. des Schutzwertes wurde berechnet, indem man den log. der LD_{50} der vaccinierten Gruppen vom log. der LD_{50} der Kontrollgruppen subtrahierte.

Ein Impfstoff galt als ausreichend wirksam, wenn die immunisierten Tiere wenigstens gegen 1000 LD_{50} des Infek-

tionsvirus geschützt waren, also einen Schutzwert von $\geq 10^{3,0}$ aufwiesen.

2. N.I.H.-Test

Die Immunisierung der Mäusegruppen geschah mit verschiedenen Verdünnungen sowohl der zu prüfenden als auch der Referenzvaccine; die Belastungsinfektion wurde mit einer einheitlichen, auf eine bestimmte Viruskonzentration eingestellten Virussuspension vorgenommen ("Antigenextinktionstest").

Immunisierung der Mäuse

Die zu immunisierenden Mäuse wurden in 4 Gruppen zu je mindestens 16 Mäusen aufgeteilt.

Die zu prüfenden Impfstoffe und die Referenzvaccine wurden in einer Verdünnungsreihe von 1 : 5 bis 1 : 625 verdünnt und die Mäuse jeder Gruppe mit 0,5 ml der einzelnen Vaccineverdünnungen intraperitoneal injiziert. Die Immunisierung erfolgte zweimal in Abstand von einer Woche.

Inokulation der Mäuse

14 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die vaccinierten Mäuse mit 0,03 ml einer zwischen 5 und 50 LD₅₀ enthaltenden Suspension von Virus fixe, Stamm CVS, intracerebral infiziert. Gleichzeitig wurde eine Virustitration in Kontrolltieren (4 Gruppen von je 10 Mäusen) durchgeführt.

Die einzelnen Mäusegruppen wurden mit dem Testvirus bzw.

Verdünnungen von 10^{-1} - 10^{-3} infiziert. Testergebnisse wurden nur berücksichtigt, wenn alle Kontrolltieren, die die Testdosis erhalten hatten, starben.

Beobachtung

Erfolgte wie im Habel-Test.

Berechnung

Die Ergebnisse wurden ausgedrückt durch die Beziehung, die jeweils zwischen der 50% wirksamen Dosis (ED_{50} = effective dose) der Testvaccine und jener der Referenzvaccine bestand. Die ED_{50} wurde nach REED und MUENCH, wie von SELIGMANN (1966) angegeben, berechnet. Es wurden 2 Methoden verwendet:

- a. Gravimetrische Methode : ED_{50} = Gehirnteil der Vaccine in mg, welcher 50% der infizierten Mäuse schützte (bei Nervengewebevaccine).
- b. Volumetrische Methode : ED_{50} = Vaccineverdünnung, die 50% der infizierten Mäuse schützte.

Bei der Berechnung der ED_{50} mit der gravimetrischen Methode wurde der Antigenitätswert (AV = antigenic value) durch Division der ED_{50} der Referenzvaccine mit der ED_{50} der Testvaccine erhalten.

Umgekehrt wurde bei der Berechnung nach der volumetrischen Methode der AV durch Division der ED_{50} der Testvaccine mit der ED_{50} der Referenzvaccine berechnet.

Für eine positive Beurteilung sollte der Antigenitätswert (AV) der Testvaccine mindestens 0,30 oder höher betragen.

3. Antikörperbindungstest nach ARKO - WIKTOR - SIKES (1973)

In diesem Test wurden Test- und Referenzvaccine- Verdün-
nungen zunächst mit einem Standard-Tollwut-Immunserum in-
kubiert. Die Untersuchungen von ARKO, WIKTOR und SIKES
(1970) zeigten nämlich auf, daß das im Tollwutimpfstoff
enthaltene Antigen Serumantikörper adsorbiert. Das Vor-
handensein von nicht adsorbierten Antikörpern wurde da-
nach mit dem Standard-Serum-Neutralisationstest (ATANASIU
1973) ermittelt.

Testverlauf

1. Sowohl die Test- als auch die Standardvaccine wurden
mit 2% inaktiviertes Pferdeserum in PBS, in zweier-
Potenzen von 1 : 2 bis 1 : 256 oder 512 verdünnt..
Die lyophilisierten Zellkultur-Vaccinen wurden für
diesen Test in Virusverdünnungslösung ohne $\text{Al}(\text{OH})_3$ -
Zusatz resuspendiert.
2. Das Tollwut-Immunserum WS - 1 (Behringwerke Marburg/
Lahn) wurde so verdünnt, daß in 1 ml 0,1 I.U. ent-
halten waren.
3. 0,5 ml von jeder Vaccineverdünnung wurden mit der glei-
chen Menge Immunserum-Verdünnung gemischt und 1 Stunde
bei 37°C in Wasserbad gehalten.
4. Nach der Inkubation wurde 1 ml Tollwutvirussuspension
(Stamm CVS) zugefügt. Die Virussuspension enthielt
5 - 50 MIC (= Mäuseinfektiöse Dosen₅₀ / 0,03 ml, ermit-
telt durch i.c. Inokulation).

5. Die Vaccine-Serum-Virus-Mischungen wurden 90 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend im Eiswasserbad gehalten.
6. Danach wurden pro Vaccineverdünnung je 6 Mäuse mit 0,03 ml Gemisch intracerebral inokuliert.
Es wurden zusätzlich Versuche mit je 8, 10, 14 und 16 Mäusen pro Verdünnung durchgeführt.
7. Die Mäuse wurden 14 Tage lang beobachtet.
8. Berechnung:

Die abgestorbenen und überlebenden Tiere wurden gezählt und der 50% ige Endpunkt mit der Methode nach REED und MUENCH berechnet.

Die " effektive 50% ige Vaccineadsorptionsdosis " (AD_{50}) wurde errechnet durch die Ermittlung jener Vaccineverdünnung, die Tollwutantikörper derart zu adsorbieren vermochte, daß nach Viruszusatz das Immunserum nur 50% der Mäuse gegen eine Tollwuterkrankung schützte.

Der Antigenitätswert wurde errechnet durch Division der AD_{50} der Testvaccine mit der AD_{50} der Standardvaccine.

III.B. E r g e b n i s s e

III.B. 1. Habel-Test

In Tabelle 1 ist die Berechnung des Schutzwertes der Hempt-Vaccine Op.Nr.526 im Habel-Test dargestellt. Bei den Kontrollmäusen, die mit Virusverdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} infiziert wurden, waren 3 Mäuse vor dem 5.Tag gestorben; dadurch war die Gesamtzahl der Tollwut-positiven und überlebenden Tiere geringer als 10.

Der Schutzwert der Vaccine lag mit $10^{3,9}$ LD₅₀ über dem geforderten Mindestwert.

In Abb.1 sind die normal verlaufenden Mortalitätskurven niedergelegt. Die Mortalitätskurven der vaccinierten Mäuse und der Kontrollen haben eine gleichlaufende Tendenz.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Prüfung aller Hempt-Vaccinen im Habel-Test zusammengestellt.

Die Schutzwerte der Hempt-Vaccinen Op.Nr.520 und 516 lagen im Test unter dem geforderten Mindestwert.

Die Untersuchungen von JAEGER und BARTH (1967) zeigten jedoch, daß in Habel-Tests bei Verwendung von NMRI-Mäusen niedrigere Werte erzielt werden als mit Albany- und Burnet-Mäusen. Die Ergebnisse in der Tabelle 2 dürften nach diesen Angaben ca. 1 log. höher liegen, wenn Albany-Mäuse verwendet worden wären, sodaß der geforderte Mindestwert von $10^{3,0}$ erreicht

worden wäre. Albany- oder Burnet-Mäuse standen für meine Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Die Zellkultur-Versuchsvaccinen HTW 35, HTW 37, GTW 133a, GTW 134 a, GTW 54 a, GTW 56 a erwiesen sich — außer der Vaccine HTW 36 — im Habel-Test als gut wirksam (Tabelle 3).

Bei den Vaccinen GTW 54 a und 56 a überlebten alle vaccinierten Tiere, selbst bei zweimaliger Prüfung. Dadurch lag die LD_{50} unter 10^{-1} und konnte nicht berechnet werden. Die Schutzwert von $>10^4$ und $>10^{5,5}$ sind demnach sehr gut, ein Schutzwert von $10^{5,5}$ entspricht einem Schutz gegen mindestens 316.000 LD_{50} .

Die Substandardvaccine A 18 wies mit derselben Testmethode nach einer Verdünnung von 1 : 80, die einem Anteil an Nervengewebe von 0,125% entsprach — gefordert sind 0,5% — einen sehr guten Schutzwert von $10^{4,5}$ LD_{50} auf.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen auf, daß im Habel-Test bei den vaccinierten Mäusen eine biphasische Mortalitätskurve (" humpbacked curve ") vorkommen kann (Abbildung 2). Bei diesem Phänomen überlebt eine größere Zahl von Mäusen, die mit hohen Virusdosen infiziert wurden. Wird hier die Methode nach REED und MUENCH zur Auswertung verwendet, werden diese Unregelmäßigkeiten maskiert. In derartigen Fällen, oder auch wenn alle vaccinierten Mäuse gegen alle Virusverdünnungen geschützt sind (Abbildung 3), läßt die Methode keine quantitative Beurteilung mehr zu, da man keine in Zahlen ausgedrückten Ergebnisse

zur Verfügung hat (SOULEBOT et al.1967).

III.B. 2. N.I.H.-Tests

In Tabelle 4 ist die Berechnung des Antigenitätswertes einer Vaccine im N.I.H.-Test dargestellt.

Da es sich um eine Zellkultur-Vaccine handelte, wurde die ED₅₀ Verdünnung der Testvaccine und der Substandardvaccine A 18 nach der volumetrischen Methode bestimmt.

Der Antigenitätswert der Testvaccine GTW 54 a lag mit 0,86 über dem geforderten Mindest-AV von 0,30.

In Abbildung 4 sind die fast parallel verlaufenden Mortalitätskurven der Test- und Substandardvaccine aufgezeichnet. Bis zur Verdünnung 1 : 125 starben mehr Mäuse, die mit der Substandardvaccine geimpft waren. Nach der Berechnung erreichte jedoch die Standardvaccine eine höhere ED₅₀ als die Testvaccine.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Prüfung von verschiedenen Vaccinen im N.I.H.-Test zusammengestellt. Die Antigenitätswerte wurden unter Berechnung der ED₅₀ nach der volumetrischen Methode bestimmt.

In 2 Testreihen (II und III) lag die Belastungsdosis nicht in dem geforderten Bereich zwischen 5 und 50 LD₅₀. Die zu hohe Belastungsdosis in Testreihe II (> 100 LD₅₀) spielte in diesem Falle keine große Rolle, da alle vaccinierten Mäuse die gleiche, in jedem Falle ausreichende

de Virusdosis bekamen, sodaß die Wirksamkeit der Vaccine verglichen werden konnte (SIKES und LARGHI 1967; SOULEBOT et al.1967).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe III, in der die Belastungsdosis zu niedrig war, können nur qualitativ interpretiert werden, da alle Mäuse, die mit der Substandardvaccine A 18 geimpft worden waren, überlebten. Anhand der Ergebnisse kann nur ausgesagt werden, daß die Hempt-Vaccine Op.Nr.520 die niedrigste und Vaccine A 18 die höchste Antigenität besaß.

Die Vaccinen HTW 36 und HTW 37 lagen dazwischen, wobei HTW 37 eine höhere Antigenität aufwies als HTW 36. Ob die Vaccinen den geforderten Mindestwert erreichten, konnte mit dieser Testreihe nicht ermittelt werden.

In 3 von 4 Testreihen lag der Antigenitätswert der Hempt-Vaccine unter 0,3.

Die Vaccine A 18, die im N.I.H.-Test als Substandard verwendet wurde, lag bei einer Prüfung gegenüber der N.I.H.Referenzvaccine mit einem AV von 0,74 über dem geforderten Mindestwert von 0,30.

Die Zellkultur-Versuchsvaccine HTW 35 und GTW 133 a bestanden den N.I.H.-Test nicht. Die Vaccine GTW 134 a erreichte gerade noch den Mindest-AV von 0,30.

Die Zellkultur-Versuchsvaccinen GTW 54 a und GTW 56 a wurden dreimal im N.I.H.-Test geprüft, wobei die Antigenitätswerte zwischen 0,52 und $> 2,46$ lagen. Diese Vaccinen erwiesen sich in diesem Test von ausgezeichneter Wirksamkeit.

In Tabelle 6 ist die Berechnung des Antigenitätswertes einer Hempt-Vaccine nach der gravimetrischen Methode dargestellt.

In Tabelle 7 sind die Antigenitätswerte von verschiedenen Nervengewebevaccinen zusammengestellt.

Die Berechnung erfolgte hier mit beiden Methoden:

a. nach der gravimetrischen Methode

b. nach der volumetrischen Methode.

Im allgemeinen liegen die Antigenitätswerte, die mit der gravimetrischen Methode berechnet wurden, etwas höher als die mit der volumetrischen Methode errechneten.

In der Versuchsreihe IV war für die Hempt-Vaccine Op.Nr. 534 die Berechnung nach der volumetrischen Methode günstiger, da damit der Mindestwert von 0,30 erreicht wurde. In den übrigen Versuchsreihen brachte keine von beide Methoden im Endergebnis einen entscheidenden Vorteil.

III.B. 3. Antikörperbindungstest nach ARKO - WIKTOR - SIKES

Da über diesen Test bisher nur sehr wenig Erfahrungen vorliegen, wurden zunächst Versuche durchgeführt, die den Einfluß der Zahl der verwendeten Mäuse pro Vaccineverdünnung auf das Endergebnis sowie die Brauchbarkeit der Substandardvaccine A 18 für diesen Test klären sollten.

Die Tabellen 8,9,10 und 11 zeigen die Antigenitätswert-Berechnung von Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit 6,8,10 und 16 Mäusen je Vaccineverdünnung. Als Standard diente die N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180. Die Antigenitätswerte lagen zwischen 1,66 und 2,08. Die Vaccine A 18 war demnach im Antikörperbindungstest potenter als die N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180. Mit 6 und 16 Mäusen pro Verdünnung wurden praktisch gleiche Antigenitätswerte erzielt (2,06 und 2,08), ebenso bei Verwendung von 8 und 10 Mäusen (1,66 und 1,67). Die Ergebnisse zeigen, daß auch bei diesem Test unter standardisierten Bedingungen mit derselben Vaccine mit einer gewissen Schwankungsbreite gerechnet werden muß. Die Zahl der verwendeten Mäuse pro Vaccineverdünnung spielt dabei offensichtlich keine wesentliche Rolle, solange nicht bei der Verwendung von 6 Mäusen Tiere interkurrent ausfallen.

Die Tabelle 12 umfaßt alle Testergebnisse über Vaccinen, die mit der Vaccine A 18 als Substandard geprüft wurden. In 2 Testreihen (Nr.5 und 8) lag die Belastungsdosis nicht in dem geforderten Bereich zwischen 5 und 50 LD₅₀. Im Versuch Nr. 5 konnte die AD₅₀ der Vaccine A 18 nicht bestimmt werden, da alle Mäuse durch die zu hohe Belastungsdosis (251 LD₅₀) starben.

Im Versuch Nr. 8 war die Belastungsdosis zu niedrig (4,4 LD₅₀), sodaß die AD₅₀ der Hempt-Vaccine nicht bestimmt werden konnte, da hier alle Mäuse überlebten. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind lediglich qualitativ zu bewerten, d.h. die Hempt-Vaccine hatte die geringste Antigenität verglichen mit den Vaccinen GTW 54 a und 56 a, die wiederum weniger Antigenität aufwiesen als die Substandardvaccine A 18.

Zu Beginn der Untersuchungen (Versuche Nr.1 - 12) schwankten die Antigenitätswerte der gleichen Vaccine in der verschiedenen Versuchsreihen sehr stark (ausgenommen die Versuche Nr.5 und 8, bei denen die Belastungsdosis nicht zwischen 5 und 50 LD₅₀ lag). Bei der Hempt-Vaccine Op.Nr.516 lagen bis 19fache Wertunterschiede, bei der Vaccine GTW 54 a bis 11fache und bei der Vaccine GTW 56 a sogar bis 16fache Wertunterschiede vor. Bei den späteren Versuchsreihen (Versuche Nr.13 - 18) lagen jedoch die Wertunterschiede — außer einmal bei der Vaccine GTW 56 a (Nr.16: 4,8facher Wertunterschied) — wesentlich niedriger (1,1facher- bei der Hempt-Vaccine Op.Nr.516 und 1,7facher

Wertunterschied bei Vaccine GTW 54 a). Diese Testergebnisse zeigten, daß die Technik des Untersuchers für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eine wesentliche Rolle spielt und daß nach entsprechender Einarbeitung durch sorgfältiges Arbeiten gute Versuchsergebnisse erzielt werden können.

Tabelle 13 zeigt die Prüfungsergebnisse der Hempt-Vaccine Op.Nr.516 und der Zellkultur-Vaccinen GTW 54 a, GTW 56 a. sowie der Substandardvaccine A 18 mit der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 als Standard.

Die Berechnung des Antigenitätswertes von Vaccine A 18 wurde in den Tabellen 8,9,10 und 11 aufgezeigt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen, die zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt während der gesamten Untersuchungen erzielt wurden, haben alle — außer einmal bei der Vaccine GTW 56 a (Nr.4: 4,9facher Wertunterschied zu den übrigen Versuchsreihen) — Wertunterschiede von lediglich maximal 2fach bei der Hempt-Vaccine Op.Nr.516, 1,35fach bei der Vaccine GTW 54 a und sogar nur 0,25fach bei der Substandardvaccine A 18.

In Tabelle 14 sind die Antigenitätswerte verschiedener Vaccinen, die sowohl mit Vaccine A 18 als Substandard als auch mit N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 bestimmt wurden, gegenübergestellt. Die Antigenitätswerte, die mit der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 erhalten wurden, sind im Durchschnitt um den Faktor 1,8höher als die mit der Vaccine A 18.

In Tabelle 15 sind die Prüfungsergebnisse aller Vaccinen zusammengestellt, die mit mindestens 2 Methoden untersucht worden waren. Außer den Vaccinen GTW 54 a, GTW 56 a und der Hempt-Vaccine Op.Nr.516 standen die übrigen Testvaccinen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um eine mehrmalige Wiederholung des Versuches bzw. eine Prüfung mit allen drei Methoden zu ermöglichen.

Die Hempt-Vaccinen erreichten nur im Habel-Test und auch hier nur 2 von 5 Fällen den erforderlichen Mindestwert von $10^{3,0}$; im N.I.H.-Test hingegen nur 1 von 5 Fällen und diese eine nur mit dem Grenzwert von 0,3. Bei den Hempt-Vaccinen traten bei mehrmaliger Untersuchung der gleichen Vaccine im N.I.H.-Test bis zu 10fache Unterschiede im Ergebnis auf.

Die Vaccinen, die die Prüfung im N.I.H.-Test bestanden (GTW 54 a, GTW 56 a, Hempt-Vaccine Op.Nr.534, HTW 37 und GTW 134 a) erreichten auch im Habel-Test den geforderten Schutzwert von mindestens 1000 LD₅₀.

Die Vaccinen Hempt Op.Nr.526, HTW 35 und GTW 133 a bestanden die Prüfung im Habel-Test, erreichten aber nicht den geforderten AV von mindestens 0,30 im N.I.H.-Test.

Die Vaccine Hempt Op.Nr.520 bestand weder die Prüfung im Habel-Test, noch im N.I.H.-Test.

Die Vaccinen GTW 54 a und 56 a mit relativ hohen AV in den späteren und damit wesentlichen Versuchsreihen im Antikörperbindungstest (zwischen 0,43 und 2,54) bestanden auch den Habel- und N.I.H.-Test.

Der Antikörperbindungstest lieferte die niedrigsten Ergebnisse von allen drei Prüfungsmethoden.

Die Hempt-Vaccine Op.Nr.516 erzielte in 90% der Versuche im Antikörperbindungstest einen AV unter 0,30. Diese Vaccine hat auch den N.I.H.-Test nicht bestanden. Im Habel-Test erreichte die Vaccine Schutzwerte von $10^{2,7}$ und $10^{2,9}$. Der Habel-Test wurde wie alle anderen Tests mit NMRI-Mäusen durchgeführt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist diese Vaccine nach der Prüfung im Habel-Test noch als brauchbar zu betrachten.

In Tabelle 16 wurden jene Testreihen im Antikörperbindungstest zusammengestellt, die Unregelmäßigkeiten in der Mortalitätskurve aufwiesen. Die Mortalitätskurven verliefen bi- oder mehrphasisch. In allen Fällen waren die Versuche nach der Empfehlung der WHO mit mindestens 6 Mäusen je Vaccineverdünnung durchgeführt worden. 6 Mäuse je Vaccineverdünnung erscheinen jedoch im Vergleich zum Habel-Test, bei dem mindestens 10 Mäuse pro Verdünnung verwendet werden und das Virus in 10 er-Potenzen verdünnt wird, zuwenig. Im Antikörperbindungstest und auch im N.I.H.-Test (16 Mäuse je Vaccine-Verdünnungsgruppe) werden die Mäuse nur mit höchstens 50 LD₅₀ infiziert; im Habel-Test gibt es keine fixierte Höchstdosis. Es wäre deshalb sinnvoll, die Anzahl der Mäuse pro Verdünnung im Antikörperbindungstest zu erhöhen, um die Unregelmäßigkeiten in der Mortalitätskurve aufzufangen, die u.A.durch die geringen Virustiterunterschiede pro infizierte Gruppe auftreten.

In Abbildung 5 wird gezeigt, daß die mehrphasische Mortalitätskurve der Testvaccine, die mit 6 Mäusen je Vaccineverdünnung erzielt wurde, korrigiert werden konnte, wenn die Mortalitätsraten aus einem Paralleltest mit 10 Mäusen je Vaccineverdünnung dazugezählt wurden.

IV. D i s k u s s i o n

Die Untersuchungen hatten das Ziel, eine neue Methode zur Prüfung von Tollwutvaccinen — den Antikörperbindungstest nach ARKO-WIKTOR-SIKES — neben den zwei von der WHO empfohlenen Tests (Habel- und N.I.H.-Test) zu überprüfen. Über die Brauchbarkeit des Habel-Tests zur Prüfung von Hempt-Vaccinen wurde in der BRD viel diskutiert (ERCEGOVAC 1954; MÖBEST 1958; ZUNKER und BULLING 1958; MATEWA 1959; GLATHE 1966; KUWERT 1967; JAEGER und BARTH 1967, 1968; BARTH 1970); andererseits liegen praktisch keine Untersuchungen über die Eignung des N.I.H.-Testes zur Prüfung von Tollwutvaccinen vor.

Der Antikörperbindungstest wurde besonders zur Prüfung von Zellkultur-Vaccinen oder gereinigten Vaccinen entwickelt. Über diesen Test, der erst 1973 von der WHO zur Prüfung von Tollwutvaccinen zur Erprobung empfohlen wurde, liegen bisher keine Erfahrungen vor.

Im folgenden werden die bei den vorliegenden Untersuchungen gemachten Erfahrungen besprochen.

a. Der Habel-Test

Die Hempt-Vaccinen hatten im Habel-Test Schutzwerte, die um den erforderlichen Mindestwert von $10^{3,0}$ lagen ($10^{2,3}$ – $10^{3,9}$). Berücksichtigt man bei den Ergebnissen, daß die Versuche mit NMRI-Mäusen durchgeführt wurden und daß dadurch die erzielten Werte um ca. 1 log niedriger lagen

als bei Verwendung von Albany-Mäusen (JAEGER und BARTH 1967), ist der Habel-Test als ein durchaus brauchbares Verfahren zur Prüfung von Hempt-Vaccinen anzusehen. Bei der Erstellung von generellen Prüfungsrichtlinien müßten jedoch diese Gegebenheiten berücksichtigt werden.

Die geprüften Zellkultur-Vaccinen erzielten — außer Vaccine HTW 36 — Schutzwerte zwischen $10^{3,0}$ und $>10^{5,5}$.

Die Vaccinen GTW 54 a und GTW 56 a hatten mit Schutzwerten von $>10^4$ und $>10^{5,5}$ eine besonders gute Wirksamkeit.

Bei solchen potenten Vaccinen ist es oft nicht mehr möglich, rechnerisch einen Schutzwert zu bestimmen. Derartige Fälle kommen vor, wenn die Gesamtheit der vaccinierten Mäuse gegen alle Virusverdünnungen geschützt ist. Umgekehrt kann es bei Vaccinen mit sehr schwacher Wirksamkeit vorkommen, daß die LD_{50} nicht bestimmt werden kann, weil die vaccinierten Mäusen zum größten Teil sterben.

Der Habel-Test ist demnach zur Prüfung von hochpotenten Vaccinen weniger geeignet.

Die Vaccine A 18, die im N.I.H.-Test und Antikörperbindungstest als Substandard verwendet wurde, hatte selbst nach einer Verdünnung 1 : 80 — entsprechend einem Nervengewebe-Anteil von 0,125% anstelle der geforderten 0,5% — einen Schutzwert von $10^{4,5}$ LD_{50} ; sie zeigte also eine ausgezeichnete Wirksamkeit.

In den vorliegenden Versuchen traten im Habel-Test nach der Belastungsinfektion bei den vaccinierten Mäusen in 13% der Untersuchungen biphasische Mortalitätskurven auf. Die mit stärkeren Virusdosen infizierten Mäuse hatten hierbei eine höhere Überlebensquote als die mit geringeren Dosen belasteten Gruppen. In solchen Fällen besteht bei Verwendung der Methode nach REED und MUENCH zur Titerberechnung die Gefahr, daß derartige Unregelmäßigkeiten maskiert werden. Verantwortlich für diese biphasische Mortalitätskurven könnte das Phänomen der Autointerferenz sein, das nach SELIMOV et al. 1960 sowie CRICK und BROWN 1974 nach Infektion mit hohen Virusdosen auftritt.

Ein Nachteil des Habel-Testes ist die aufwendige 6-malige Vaccinierung innerhalb von 2 Wochen.

Bei diesem Test sollte wie beim N.I.H.-Test eine Standardvaccine mitgeführt werden. Dadurch würden Schwankungen bei der Auswertung ausgeglichen. Bei der Verwendung einer Standardvaccine könnte sogar die Zahl der Immunisierungen beschränkt werden. Dies würde eine wesentliche Vereinfachung des verhältnismäßig aufwendigen Habel-Testes bedeuten (JAEGER und BARTH 1967).

Trotz aller Nachteile ist dieser Test von allen Prüfmethoden am einfachsten durchzuführen, da hier lediglich gefordert wird, daß die LD_{50} des Belastungsvirus nicht unter 10^{-5} liegt.

b. Der N.I.H.-Test

Der N.I.H.-Test wurde mit der Vaccine A 18 als Standardvaccine durchgeführt.

Die Antigenitätswerte der Hempt-Vaccinen lagen im N.I.H.-Test fast ausschließlich unter dem geforderten Mindestwert von 0,30. Auch erzielten die experimentellen Zellkultur-Vaccinen HTW 35, HTW 36 und GTW 133 a ungenügende Antigenitätswerte in diesem Test.

Lediglich die Zellkultur-Vaccinen GTW 54 a und GTW 56 a erbrachten Antigenitätswerte, die zwischen 0,52 und $> 2,46$ lagen.

Der N.I.H.-Test ist weniger aufwendig als der Habel-Test, da hier nur 2 mal statt 6 mal innerhalb von 2 Wochen immunisiert wird. Außerdem wird im N.I.H.-Test eine Standardvaccine mituntersucht; dadurch besteht die Möglichkeit, die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen miteinander zu vergleichen. Voraussetzung ist allerdings, daß die Standardvaccine über lange Zeit einen gleichbleibenden Antigenitätswert besitzt. Über die Schwierigkeit der Herstellung solcher stabilen Vaccinen wurde früher mehrfach berichtet (STECK und SCHNEIDER 1963; KISSLING und REESE 1963; DEAN und SHERMAN 1962; JAEGER und BARTH 1967, 1968).

Die Vaccine A 18, die im Test als Substandard verwendet wurde, war bereits von JAEGER und BARTH (1968) auf ihre Eignung als Substandardvaccine untersucht worden. Sie erbrachte in den vorliegenden Untersuchungen sehr gute Ergebnisse. Die Vaccine A 18 entspricht durchaus den an eine Standardvaccine gestellten Anforderungen.

Es ist nicht bekannt, ob bei der Verwendung von NMRI-Mäusen im Gegensatz zu Albany-Mäusen die Ergebnisse im N.I.H.-Test wie im Habel-Test beeinflußt werden; es ist jedoch anzunehmen, daß auch im N.I.H.-Test mit entsprechenden Unterschieden im Ergebnis zu rechnen ist.

Der N.I.H.-Test ist für die Prüfung der Wirksamkeit von verschiedenen Tollwutvaccinen geeignet; jedoch sollte dieser Test nicht zur Untersuchung von Hempt-Vaccinen angewendet werden, da in der Regel bei diesen Vaccinen nicht ausreichende Antigenitätswerte zu erwarten sind. Dies dürfte durch die unterschiedlichen Vaccinierungsverfahren bedingt sein.

c. Der Antikörperbindungstest nach ARKO - WIKTOR - SIKES

Es wurden zunächst Versuche durchgeführt, die den Einfluß der Zahl der verwendeten Mäuse pro Vaccineverdünnung auf das Endergebnis sowie die Brauchbarkeit der Substandardvaccine A 18 für diesem Test klären sollten. Um die Brauchbarkeit des Tests zu untersuchen, wurden sowohl

Nervengewebe- als auch Zellkultur-Vaccinen mehrmals geprüft.

Die Berechnung des Antigenitätswertes von Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit 6,8,10 und 16 Mäusen je Vaccineverdünnung zeigte, daß die Zahl der verwendeten Mäuse pro Vaccineverdünnung für das Endergebnis offensichtlich keine wesentliche Rolle spielt, solange nicht bei der Verwendung von 6 Mäusen Tiere interkurrent ausfallen. Um dieser Möglichkeit vorzubeugen, sollte die Zahl der Mäuse pro Vaccineverdünnung mehr als 6 betragen.

Die Vaccine A 18 erzielte Antigenitätswerte zwischen 1,66 und 2,08 bzw. einen durchschnittlichen Antigenitätswert von 1,80 gegen die N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180.

Es ist deshalb anzunehmen, daß die Antigenitätswerte von Vaccinen, die im N.I.H.- oder im Antikörperbindungstest mit Vaccine A 18 als Substandard geprüft wurden, höher liegen, wenn sie mit der internationalen Standardvaccine geprüft worden wären.

Wie auch im N.I.H.-Test lagen die Antigenitätswerte der Hempt-Vaccinen nahezu alle (92%) unter 0,30.

In 57% der Prüfungen der Zellkultur-Vaccine GTW 54 a mit Vaccine A 18 als Substandard lagen die Antigenitätswerte über 0,30.

Mit N.I.H.-Referenzvaccine als Standard lagen die Antigenitätswerte bei der Testvaccine GTW 54 a alle zwischen 0,87 und 2,05 und bei GTW 56 a zwischen 0,43 und 2,54.

Zu Beginn der Untersuchungen ergaben sich bei der mehrmaligen Überprüfung derselben Vaccinen starke Schwankungen in den Ergebnissen (zB. bis 16fach bei Vaccine GTW 56 a), bei den letzten Versuchsreihen jedoch lagen die Wertunterschiede wesentlich niedriger (maximal 1,7fach), mit Ausnahme einer von 18 Versuchsreihen (5fache Schwankung bei GTW 56 a). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Technik des Untersuchers bei derartigen Methoden eine große Rolle spielt und erst nach Einarbeitung gute Ergebnisse erzielt werden können (ARKO, WIKTOR und SIKES 1970, berichteten über bis zu 2,25fache AV-Unterschiede).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß der Antikörperbindungstest eine brauchbare, direkte Methode zur Überprüfung des Antigengehaltes von Impfstoffen ist. Durch weitere Untersuchungen mit diesem Test müßte zunächst jedoch ein Antigenitätsgrenzwert für brauchbare Vaccinen festgelegt werden.

Im Antikörperbindungstest wird ausschließlich die Menge des Antigens ermittelt, die von Tollwutserum-Antikörpern während der Inkubation gebunden wurde. Andere wirksame Faktoren, wie z.B. "verborgenes" Antigen oder Adjuvan-

tien werden nicht erfaßt.

Bei diesem Test entfallen die Impfungen, wie sie beim Habel- und N.I.H.-Test durchgeführt werden müssen. Dadurch werden gewisse Fehlerquellen, die bei der Vaccinierung entstehen können, von vornherein ausgeschaltet. Außerdem wird die Versuchsdauer von 28 Tagen beim Habel- und N.I.H.-Test auf 14 Tage verkürzt.

Ein weiterer Vorteil ist, daß der Antikörperbindungstest auch in Zellkulturen, z.B. unter Verwendung der Hamsternierenzelllinie BHK 21, durchgeführt werden kann. Als Testgrundlage dient in diesem Falle der Plaque-Reduktionstest nach SEDWICK und WIKTOR (1967). In Zellkulturen dauert der Test nur 5 Tage. Die Verwendung von Zellkulturen für den Antikörperbindungstest ist jedoch auf entsprechend eingerichtete Labors beschränkt.

Nervengewebevaccinen können Tollwutantigen enthalten, das im Antikörperbindungstest nicht erfaßt wird. Dadurch können einerseits die Antigenitätswerte stark schwanken, andererseits können die Ergebnisse niedriger liegen als im N.I.H.-Test, obgleich es sich um durchaus wirksame Vaccinen handelt (ARKO et al. 1970).

Niedrige Antigenitätswerte von Hempt-Vaccinen im Antikörperbindungstest können auch durch den Phenolgehalt dieser Vaccinen verursacht werden, da das Phenol das Belastungsvirus bis zu einem gewissen Grad inaktivieren kann.

Beziehungen zwischen Habel-, N.I.H.- und Antikörperbindungstest

Alle Vaccinen, die im Antikörperbindungstest Antigenitätswerte von mindestens 0,3 hatten, bestanden auch die Prüfung im N.I.H.- und Habel-Test.

Alle Vaccinen, die im N.I.H.-Test bestanden, hatten einen Schutzwert von mindestens 1000 LD₅₀ im Habel-Test.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, kann aber eine Vaccine den Habel- Test bestehen, ohne im N.I.H.-Test den Grenzwert zu erreichen. Ähnliche Beobachtungen machten bereits LAVENDER und VAN FRANK 1971, und LAVENDER 1972.

V. Z u s a m m e n f a s s u n g

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Verfahren zur Prüfung der Wirksamkeit von inaktivierten Tollwutvaccinen — der Antikörperbindungstest nach ARKO-WIKTOR-SIKES — auf seine Eignung als Ersatz für die bisher gebräuchlichen Methoden (Habel- und N.I.H.-Test) untersucht. Verschiedene Vaccinen wurden im Habel- und N.I.H.-Test, im Antikörperbindungstest und auch mit allen drei Methoden gleichzeitig geprüft.

Hinsichtlich der Brauchbarkeit der verschiedenen Methoden wird folgendes festgestellt.

1. Der Habel-Test ist besonders geeignet für die Prüfung von Hempt-Vaccinen.

Bei hochpotenten Vaccinen ist es nicht möglich, einen exakten Schutzwert zu bestimmen, da die Gesamtheit der vaccinierten Mäuse gegen alle Virusverdünnungen geschützt ist.

Es wäre empfehlenswert, auch beim Habel-Test wie beim N.I.H.-Test eine Standardvaccine mitzuführen. Dadurch werden die von verschiedenen Untersuchern erzielten Ergebnisse besser vergleichbar.

2. Der N.I.H.-Test erscheint insgesamt vorteilhafter als der Habel-Test, da hier nur 2mal statt 6mal innerhalb von 2 Wochen immunisiert wird. Jedoch ist dieser Test für die Prüfung von Hempt-Vaccinen wenig geeignet.

Der geforderte Antigenitätswert wird bei dieser Vaccine

nur in seltenen Fällen erreicht. Bei mehrmaliger Wiederholung der Prüfung von Hempt-Vaccinen kommt es zu stark differierenden Werten.

Vaccinen, die im N.I.H.-Test die Prüfung bestanden, bestanden sie auch im Habel-Test. Für den umgekehrten Fall trifft dies nicht immer zu.

Mit dem Test lassen sich auch die Antigenitätswerte von hochpotenten Vaccinen noch exakt bestimmen.

Durch die grundsätzliche Mitführung einer Standardvac-cine ist die Methode besser standardisiert als der Habel-Test.

Mit Ausnahme der Hempt-Vaccine ist für alle anderen Vaccinen der N.I.H.-Test zu bevorzugen.

3. Der Antikörperbindungstest nach ARKO-WIKTOR-SIKES ist ein brauchbares Verfahren zur Prüfung von inaktivierten Zellkultur-Vaccinen.

Hempt-Vaccinen erzielten in diesem Test wie im N.I.H.-Test sehr niedrige Antigenitätswerte.

Nach entsprechender Einarbeitung des Laborpersonals können mit dieser Methode gute Ergebnisse erzielt werden. Um Unregelmäßigkeiten in den Mortalitätsraten zu verhindern sollten mindestens 10 Mäuse je Vaccineverdünnung verwendet werden.

Der Test dauert bei Verwendung von Mäusen als Testsystem nur 2 Wochen, bei Verwendung von Zellkulturen 5 Tage.

Eine Immunisierung entfällt im Test.

Gemessen wird bei diesem Test nur das Antigen, das von Tollwutserum-Antikörpern während einer Inkubation von 60 Minuten gebunden wird. Alle eine Immunisierung unterstützenden Faktoren wie Adjuvans- oder Boostereffekte werden nicht berücksichtigt.

Der Antikörperbindungstest ist im Vergleich zum Habel- und N.I.H.-Test die exakteste Methode zur Ermittlung des Antigengehaltes einer Vaccine.

Dieser Test ist die am schwersten zu bestehende Wirksamkeitsprüfung für Tollwutvaccinen.

Vaccinen die im Antikörperbindungstest einen Antigenitätswert von $\geq 0,3$ erzielten, bestanden die Prüfungen im Habel- und N.I.H.-Test, nicht aber umgekehrt. Ein Antigenitäts-Grenzwert muß für diesen Test erst bestimmt werden.

VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. AASLESTAD, H.G.
WIKTOR, T.J. Recovery of Protective Activity in Rabies Virus Vaccines Concentrated and purified by Four Different Methods. Appl.Microbiol. 24, 37-43, 1972
2. ABELSETH, M.K. Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture. Can.vet.J. 5, 84-87, 1964
3. ABELSETH, M.K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. Can.vet.J. 5, 279-286, 1964
4. ABELSETH, M.K. Vaccination of Domestic Animals with a Rabies Vaccine Produced in Tissue Culture from the ERA Strain. Proc.Nat.Rabies Symp.NCDC,Atlanta, Georgia,May 5-6: 53, 1966
5. ABELSETH, M.K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. Int.Symp.on Rabies,Talloires. Series Immunobiol.Standard. 1, 367-375, 1966
6. ABELSETH, M.K. Further studies on the use of ERA-rabies vaccine in domestic animals. Can.vet.J. 8, 221-227, 1967
7. ALBRYCHT, H.
WYSOKIŃSKA, T. Studies on Immunogenicity of Rabies Vaccines. Exp.Med.Microbiol.XXIV, 137-147, 1972

8. ANONYMUS Newer Rabies Vaccines
Lancet 132, 1972
9. ARKO, R.J. Evaluation of Rabies Vaccines by an
WIKTOR, T.J. Antibody Binding Technique.
SIKES, R.K. unveröffentlich, 1970
10. ARKO, R.J. The Antibody Binding Test for Vaccine
WIKTOR, T.J. Potency.
SIKES, R.K. Laboratory Techniques in Rabies, Genf,
3rd. edition, WHO Monograph Series No. 23,
292-294, 1973
11. ATANASIU, P., BAHMANYAR, M., BALTAZARD, M., FOX, J.P., HABEL, K.,
KAPLAN, M.M., KISSLING, R.E., KOMAROV, A., KOPROWSKI, H.,
LÉPINE, P., PÉREZ GALLARDO, F., SCHAEFFER, M.
Rabies Neutralizing Antibody Response
to Different Schedules of Serum and
Vaccine Inoculations in Non-Exposed
Persons.
Bull. Wld Hlth Org. 14, 593-611, 1956
12. ATANASIU, P., CANNON, D.A., DEAN, D.J., FOX, J.P., HABEL, K.,
KAPLAN, M.M., KISSLING, R.E., KOPROWSKI, H., LÉPINE, P.,
PÉREZ GALLARDO, F.
Rabies Neutralizing Antibody Response
to Different Schedules of Serum and
Vaccine Inoculations in Non-Exposed
Persons: Part 3.
Bull. Wld Hlth Org. 25, 103-114, 1961
13. ATANASIU, P., DEAN, D.J., HABEL, K., KAPLAN, M.M., KOPROWSKI, H.,
LÉPINE, P., SÉRIÉ, C.
Rabies Neutralizing Antibody Response
to Different Schedules of Serum and
Vaccine Inoculations in Non-Exposed
Persons: Part 4.
Bull. Wld Hlth Org. 36, 361-365, 1967

14. ATANASIU, P.
RAYNAUD, J.
RAYNAUD, A.
Développement du virus rabique sur des
cellules embryonnaires de Reptiles
(Orvet, Anguis fragilis L.).
C.R.Acad.Sc.(Paris) 276, 2097-2100, 1973
15. ATANASIU, P.
Quantitative Assay and Potency Tests
of Antirabies Serum and Immunoglobulin.
Laboratory Techniques in Rabies, Genf,
3rd.edition, WHO Monograph Series No.23,
314-318, 1973
16. BAER, G.M.
CLEARY, W.F.
A Model in Mice for the Pathogenesis
and Treatment of Rabies.
J.infect.Dis. 125, 520-527, 1972
17. BARTH, R.
JAEGER, O.
Zur Modifikation des Habel-Tests.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 209, 279-288, 1969
18. BARTH, R.
Die Hempt-Vaccine und ihre Antigenität
im Habel-Test.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig., Suppl.3,
88-92, 1970
19. BARTH, R.
JAEGER, O.
Untersuchungen mit einigen Tollwutvirus-
stämmen in verschiedenen Gewebekultur-
systemen.
Zbl.Vet.-Med. B17, 363-380, 1970
20. BARTH, R.
JAEGER, O.
Untersuchungen mit inaktivierten Toll-
wut-Gewebekultur-Impfstoffen am Tier.
I.Teil: Immunisierungsversuche an Hunden
und Katzen.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 83, 81-87, 1970
21. BELL, J.F.
WRIGHT, J.T.
HABEL, K.
Rabies Vaccine Freed of Factor Causing
Allergic Encephalitis.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 70, 457-461, 1949

22. BÖHM, H. Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpfstoffen.
2.Mitteilung: Immunisierung von weißen Mäusen aus dem Handel.
Mh.Tierheilk. 14, 6-17, 1962
23. BOHLMANN, H.G. Schwere bleibende Schädigung nach Tollwutschutzimpfung mit der Hempt-Vakzine.
Med.Klin. 63, 1932, 1968
24. BRANCHE, R. Stimulation of Rabies Vaccine in Mice by Low Doses of Polyadenylic : Polyuridylic Complex.
Infection and Immunity 6, 324-325, 1972
25. BROWN, A.L. Comparative Potency Tests on Modified Live-Virus Rabies Vaccine Produced from Flury High Egg-Passage Virus Grown on Permanent Dog Kidney Cell Line.
DAVIS, E.V.
MERRY Jr., D.L.
BECKENHAUER, W.H.
Amer.J.vet.Res. 28, 751-759, 1967
26. BROWN, A.L. One-Year Immunity in Dogs Vaccinated with High-Egg-Passage Rabies Virus Grown on Established Dog Kidney Cell Line.
MERRY Jr., D.L.
BECKENHAUER, W.H.
J.Amer.vet.med.Ass. 153, 174-179, 1968
27. BROWN, A.L. Modified Live-Virus Rabies Vaccine produced from Flury High-Egg-Passage Virus Grown on Established Canine-Kidney Cell Line.
MERRY Jr., D.L.
BECKENHAUER, W.H.
Three-Year Duration -of- Immunity Study in Dogs.
Amer.J.vet.Res. 34, 1427-1432, 1973
28. CABASSO, V.J. Tissue Culture Rabies Vaccine (Flury Lep) in Dogs.
STEBBINS, M.R.
DOUGLAS, B.A.
SHARPLESS, G.R.
Amer.J.vet.Res. 26, 24-32, 1965

29. CABASSO, V.J. Rabies Vaccination of Cats with HEP
SHARPLESS, G.R. Flury Vaccine.
DOUGLAS, B.A. Amer.J.vet.Res. 26, 33-38, 1965
30. CABASSO, V.J. Canine rabies vaccines.
Proc.Nat.Rabies Symp.NCDC,Atlanta,
Georgia,May 5-6 : 45-51, 1966
31. CABASSO, V.J. Rabies Immune Globulin of Human Origin:
LOOFBOUROW, J.C. Preparation and Dosage Determination
ROBY, R.E. in Non-Exposed Volunteer Subjects.
ANUSKIEWICZ, W. Bull.Wld Hlth Org. 45, 303-315, 1971
32. CAMPBELL, J.B. Present Trends and the Future in Rabies
KAPLAN, M.M. Research.
KOPROWSKI, H. Bull.Wld Hlth Org. 38, 373-381, 1968
KUWERT, E.
SOKOL, F.
WIKTOR, T.J.
33. CHAPMAN, W.G. Inactivated Rabies Vaccine Produced from
RAMSHAW, I.A. the Flury LEP Strain of Virus Grown in
CRICK, J. BHK - 21 Suspension Cells.
Appl.Microbiol. 26, 858-862, 1973
34. CLARK, H.F. Temperature-Sensitivity Characteristics
WIKTOR, T.J. Distinguishing Substrains of Fixed Rabies
Virus: Lack of Correlation with Plaque-
Size Markers or Virulence for Mice.
J.infect.Dis. 125, 637-646, 1972
35. CLARK, H.F. Growth and Attenuation of Rabies Virus
in Cell Cultures of Reptilian Origin.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 139, 1317-1325,
1972
36. CRICK, J. Viral Subunits for Rabies Vaccination.
BROWN, F. Nature (Lond.) 222, 92, 1969

37. CRICK, J. Efficacy of rabies vaccine prepared from
 BROWN, F. virus grown in duck embryo.
 Lancet, 1106-1107, 1970
38. CRICK, J. Rabies Vaccines.
 BROWN, F. Lancet, 40-41, 1970
 TURNER, G.S.
39. CRICK, J. The vaccination of man and other animals
 against rabies.
 Postgrad.Med.J. 49, 551-564, 1973
40. CRICK, J. An Interfering Component of Rabies Virus
 BROWN, F. which contains RNA.
 J.gen.Virol. 22, 147-151, 1974
41. DEAN, D.J. Potency of Commercial Rabies Vaccine
 SHERMAN, I. Used in Man.
 Publ.Hlth.Rep.(Wash.) 77, 705-710, 1962
42. DEAN, D.J. Potency Tests of Semple-Type Rabies of
 EVANS, W.M. Nervous Tissue Origin for use in Animals.
 SHERMAN, I. J.Amer.vet.med.Ass. 142, 156-158, 1963
43. DEAN, D.J. Studies on the low egg-passage Flury
 EVANS, W.M. strain of modified rabies virus produced
 THOMPSON, W.R. in embryonating chicken eggs and tissue
 culture.
 Amer.J.vet.Res. 25, 756-763, 1964
44. DEBBIE, G. Rabies Antibody Determination by Immuno-
 ANDRULONIS, J.A. fluorescence in Tissue Culture.
 ABELSETH, M.K. Infection and Immunity 5, 902-904, 1972
45. DREESSEN, D.W. Antibody responses in cattle vaccinated
 EUBANKS, J.F. with various rabies vaccines.
 BEHYMER, D.E. J.Amer.vet.med.Ass. 157, 826-830, 1970

46. EICHWALD, C. Experimentelle serologische Beobachtungen beim Menschen und beim Tier nach Rabiesschutzimpfung.
J.Hyg.Epidem. VII, 281-289, 1963
47. EICHWALD, C. Die Tollwut bei Mensch und Tier.
PITZSCHKE, H. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967
48. EISSNER, G. Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwut-
impfstoffen.
BÖHM, H. 1.Mitteilung: Prüfungsmethoden.
Mh.Tierheilk. 14, 24-32, 1962
49. ELLENBOGEN, G. Rabies Neutralizing Antibody:
SLUGG, P. Inadequate Response to Equine Antiserum
and Duck-Embryo Vaccine.
J.infect.Dis. 127, 433-436, 1973
50. EMERY, J.B. A tissue culture modified live rabies
ELLIOT, A.Y. vaccine for dogs.
BORDT, D.E. J.Amer.vet.med.Ass. 152, 476-482, 1968
BUSCH, G.R.
KUGEL, E.E.
51. ERCEGOVAC, D. Die Wertbestimmung des Wutimpfstoffes.
Zbl.Vet.-Med. 1, 445-454, 1954
52. FENJE, P. Propagation of rabies virus in cultures
of hamster kidney cells.
Canad.J.Microbiol. 6, 479-484, 1960
53. FENJE, P. A Rabies Vaccine from Hamster Kidney
Tissue Cultures: Preparation and Evaluation in animals.
Canad.J.Microbiol. 6, 605-609, 1960
54. FENJE, P. Potentiation of tissue culture rabies
PINTERIC, L. vaccine by adjuvants.
Am.J.Publ.Hlth. 56, 2106-2113, 1966

55. FENJE, P. Protection of Rabbits against Experimen-
POSTIC, B. tal Rabies by Poly I.Poly C.
Nature (Lond.) 226, 171-172, 1970
56. FOX, J.P. Study of antirabies immunization of man.
KOPROWSKI, H. Observations with HEP Flury and other
CONWELL, D.P. vaccines, with and without hyperimmune
BLACK, J. serum in primary and recall immunization.
GELFAND, H.M. Bull.Wld Hlth Org. 17, 869, 1957
57. FUENZALIDA, E. Un método mejorado en la preparacion
PALACIOS, R. de la vacuna antirrabica.
Bol.Inst.bact.,Chile 8, 3-10, 1955
58. FUENZALIDA, E. Antirabies Antibody Response in Man
PALACIOS, R. to Vaccine Made from Infected Suckling-
BORGONO, J.M. Mouse Brains.
Bull.Wld Hlth Org. 30, 431-436, 1964
59. FUENZALIDA, E. Production of Hyperimmune Antirabies
Serum in Horses.
Bull.Wld Hlth Org. 30, 437-439, 1964
60. FUENZALIDA, E. The use of rabies vaccine prepared in
PALACIOS, R. suckling mouse brain.
BORGONO, M. Int.Symp. on Rabies,Talloires, Series
Immunobiol.Standard. 1, 339-345, 1966
61. FUENZALIDA, E. Human pre-exposure rabies immunization
with suckling mouse brain vaccine.
Bull.Wld Hlth Org. 46, 561-563, 1972
62. GIBBS, F.A. Comparation of rabies vaccines grown on
GIBBS, E.L. duck embryo and on nervous tissue.
CARPENTER, P.R. An electroencephalographic study.
SPIERS, H.W. New.Engl.J.Med. 265, 1002-1003, 1961

63. GISPEN, R. Rabies Vaccine Derived from Suckling
SCHMITTMANN, G.J.P. Rabbit Brain.
SAATHOF, B. Arch.ges.Virusforsch. 15, 366-376, 1965
64. GISPEN, R. Neutralizing and Fluorescent Antibody
SAATHOF, B. Response in Man after Antirabies Treat-
ment with Suckling Rabbit Brain Vaccine.
Arch.ges.Virusforsch. 15, 377-386, 1965
65. GLATHE, H. Die Wertbestimmung von Tollwutimpfstoff
nach Hempt im Habel- und Plantartest
nach Krause.
Z.ges.Hyg. 12, 449-454, 1966
66. GOUGH, P.M. Passive Haemagglutination Test for
DIERKS, R.E. Antibodies Against Rabies Virus.
Bull.Wld Hlth Org. 45, 741-745, 1971
67. GOFF, M.T. Federal Laboratory Testing Requirements
for Canine Vaccines.
J.Amer.vet.med.Ass. 157, 1901-1903, 1970
68. GREENBERG, M. Vaccination against rabies with duck-
CHILDRESS, J. embryo and Semple Vaccines.
J.Amer.med.Ass. 173, 333-337, 1960
69. HABEL, K. Evaluation of a mouse test for the Stan-
dardization of the immunizing power of
anti-rabies vaccines.
Publ.Hlth.Rep.(Wash.) 55, 1473-1487, 1940
70. HABEL, K. Some factors influencing the mouse
WRIGHT, J.T. potency test for rabies vaccine.
Publ.Hlth.Rep.(Wash.) 63, 44-45, 1948
71. HABEL, K. Effect on Immunity to Challenge and
Antibody Response of Variation in Dosage
Schedules of Rabies Vaccination in Mice.
Bull.Wld Hlth Org. 14, 613-616, 1956

72. HABEL, K. General Consideration in Vaccine Production.
Laboratory Techniques in Rabies, Genf, 3rd.edition, WHO Monograph Series No.23, 189-191, 1973
73. HABEL, K. General Consideration in Safety and Potency Testing.
Laboratory Techniques in Rabies, Genf, 3rd.edition, WHO Monograph Series, No.23, 271-275, 1973
74. HABEL, K. Habel Test for Potency.
Laboratory Techniques in Rabies, Genf, 3rd.edition, WHO Monograph Series No.23, 276-277, 1973
75. HABEL, K. Modified Habel Test for Potency.
Laboratory Techniques in Rabies, Genf, 3rd.edition, WHO Monograph Series No.23, 278, 1973
76. HACKENTHAL, H. Studien über den Habel-Test.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 162, 17-23, 1955
77. HENNE, K. Klinische und Klinisch-Immunologische
APITZSCH, L. Untersuchungen mit Tollwut-Zellkultur-
HÖLZER, E. und Hempt-Impfstoffen.
NITSCHKE, H. Dtsch.Gesundheitsw. 27, 2337-2341, 1972
SINNECKER, H.
SINNECKER, R.
ZILSKE, E.
78. HILDRETH, E.A. Rabies prevention 1966.
Ann.Intern.Med. 64, 1357-1360, 1966

79. HUMMELER, K. Structure and Development of Rabies
KOPROWSKI, H. Virus in Tissue Culture.
WIKTOR, T.J. J.Virol. 1, 152-170, 1967
80. HUMMELER, K. Morphology of the Nucleoprotein Com-
TOMASSINI, N. ponent of Rabies Virus.
SOKOL, F. J.Virol. 2, 1191-1199, 1968
KUMERT, E.
KOPROWSKI, H.
81. HUMMELER, K. Investigating the Rabies Virus.
KOPROWSKI, H. Nature (Lond.) 221, 418-421, 1969
82. JAEGER, O. Das Verhalten der Tollwut-Vaccine nach
BARTH, R. Hempt im Habel-Test.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 204, 452-459, 1967
83. JAEGER, O. Untersuchungen zur Herstellung eines
BARTH, R. Tollwut-Standardimpfstoffes.
Arch.Hyg.Bakteriol. 152, 379-384, 1968
84. JAEGER, O. Über die Temperaturstabilität eines
BARTH, R. lyophilisierten, inaktivierten Tollwut-
Impfstoffes.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 210, 135-139, 1969
85. JANIS, B. Rabies in Rabbit and Mice: Protective
HABEL, K. Effect of Polyriboinosinic-Polyribocy-
tidylic Acid.
J.infect.Dis. 125, 345-352, 1972
86. JANSSEN, E.G. Tollwutschutzimpfung mit tödlichem Aus-
gang.
Mschr.Kinderheilk. 118, 379-380, 1970
87. KABAT, E.A. The rapid production of acute dissemina-
WOLF, A. ted encephalomyelitis in rhesus monkeys
BEZER, A.E. by injection of heterologous and homolo-
gous brain tissue with adjuvants.
J.exp.Med. 85, 117-129, 1947

88. KABAT, E.A.
WOLF, A.
BEZER, A.E.
Studies on acute disseminated encephalo-
myelitis produced experimentally in
rhesus monkeys.
J.exp.Med. 88, 417-426, 1948
89. KAPLAN, C.
Rabies Vaccines - an Assessment.
Proc.roy.Soc.Med. 64, 10-13, 1971
90. KAPLAN, M.M.
WIKTOR, T.J.
KOPROWSKI, H.
An Intracerebral Assay Produced in Mice
for Chemical Inactivation on Rabies Virus.
Bull.Wld Hlth Org. 34, 293-297, 1966
91. KAPLAN, M.M.
Review on Developments on Vaccines for Man.
Zbl.Bakt.,I.Abtt.Orig.,Suppl.3,76-87, 1970
92. KAPLAN, M.M.
An Assessment of Laboratory Techniques
in the Diagnosis and Prevention of
Rabies and in Rabies Research.
Laboratory Techniques in Rabies,Genf,
3rd.edition,WHO Monograph Series No.23,
19-25, 1973
93. KISSLING, R.E.
Growth on Rabies Virus in Non-Nervous
Tissue Culture.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 98,223-225,1958
94. KISSLING, R.E.
REESE, D.R.
Anti-Rabies-Vaccine of Tissue Culture
Origin.
J.Immunol. 91, 362-368, 1963
95. KOPROWSKI, H.
BLACK, J.
Studies on Chick-Embryo-Adapted Rabies
Virus.
VI. Further Changes in Pathogenic Proper-
ties Following Prolonged Cultivation in
the Developing Chick Embryo.
J.Immunol. 72, 94-106, 1954

96. KOPROWSKI, H. In vitro production of antirabies vaccine.
Int.Symp.on Rabies,Talloires, Series Im-
munobiol.Standard. 1, 357-366, 1966
97. KOPROWSKI, H. Vaccines against Rabies: Present and
Future.
Proceeding of the First International
Conference on Vaccines Against Viral
and Rickettsial Disease of Man.
Pan American Health Organization
488-499, 1967
98. KRAUSE, W.W. Kritische experimentelle Studien über
die Prüfung von Tollwutimpfstoffen, die
Pathogenese der Lyssa und das Geschehen
in der Inkubationsperiode.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 167, 458-503, 1956
99. KRAUSE, W.W. The pathogenesis of rabies.
Int.Symp.on Rabies,Talloires, Series Im-
munobiol.Standard. 1, 153-158, 1966
100. KUWERT, E. Versuche zur Antigenität, Schutzkraft
und Encephalogenität der Hempt-Vaccine,
sowie Betrachtungen zur Tollwutschutz-
impfung in Deutschland.
Arch.Hyg.Bakteriol. 151, 130-145, 1967
101. KUWERT, E. Das Tollwutvirus.
Dtsch.Med.Wschr. 34, 1697-1703, 1969
102. KUWERT, E. Neue Befunde zur Struktur und Vermeh-
rung des Tollwutvirus (TWV)
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig., Suppl. 3, 1-23, 1970
103. KUWERT, E. Prä- und postinfektionelle Tollwut-
MAROUS, I. schutzimpfung.
THRAENHART, O. Dtsch.Med.Wschr. 97, 1893-1898, 1972
STAUDACHER, H.

104. KUWERT, E.
BÖHME, V.
LICKFELDT, K.G. Zur Oberflächenstruktur des Tollwut-
virion (TWV).
Zbl.Bakt., I. Abt. Orig. 219, 39-45, 1972
105. LANG, R. Etude d'un nouveau vaccin rabique.
Travail de l'institut francais de Viro-
logie-Lyon. Table Ronde sur les Mala-
dies des Chiens-Lyon. 1967
106. LARGHI, O.P.
FUENZALIDA, E. Comparaison du pouvoir immunogène d'un
Vaccine Antirabique.
Ann.Inst.Pasteur, 123, 421-426, 1972
107. LAVENDER, J.F. Purified Rabies Vaccine (Suckling Rat
Brain Origin).
Appl.Microbiol. 19, 923-927, 1970
108. LAVENDER, J.F.
VAN FRANK, R.M. Zonal-Centrifuged Purified Duck Embryo
Cell Culture Rabies Vaccine for Human
Vaccination.
Appl.Microbiol. 22, 358-365, 1971
109. LAVENDER, J.F. Immune Response in Primates Vaccinated
with Duck Embryo Cell Culture Rabies
Vaccine.
Appl.Microbiol. 25, 327-331, 1973
110. LAWSON, K.F.
WALKER, V.C.R.
CRAWLEY, J.F. ERA strain rabies vaccine, duration of
immunity in cattle, dogs and cats.
Vet.Med.Small Anim.Clin.62, 1073-1074, 1967
111. LAWSON, K.F.
CRAWLEY, J.F. The ERA Strain of Rabies Vaccine.
Canad.J.comp.Med. 36, 339-344, 1972
112. LINZENMEIER, G.
KUWERT, E. Die Encephalitogenität der Hempt-Vakzine
beim Menschen. Neurologische Komplika-
tionen nach Tollwutschutzimpfung in der
Bundesrepublik von 1955-1968.
Zbl.Bakt., I. Abt. Orig., Suppl. 3, 102-104,
1970

113. LORENZ, R.J. Methods of Calculation.
BÜGEL, K. Laboratory Techniques in Rabies, Genf,
3rd.edition, WHO Monograph Series No.23,
321-335, 1973
114. MATEWA, V. Titrierung von Phenol-Tollwutimpfstoffen
nach der Methoden von Habel und Krause.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 175, 55-58, 1959
115. MATHISON, D.A. Active rabies immunization in an indi-
vidual hypersensitive to duck embryo
vaccine.
J.Allergy Clin.Immunol. 50, 246-251, 1972
116. MATSUMOTO, K. Electron-microscopic studies on rabies
MIYAMOTO, S. virus. Multiplication and the nature of
the Negri body.
Int.Symp.on Rabies, Talloires, Series
Immunobiol.Standard. 1, 45-54, 1966
117. MAYR, A. Zur Problem einer Schutzimpfung der Hun-
STREITFERDT, U. de gegen Tollwut.
HERLYN, M. Kleintier-Praxis 18, 91-96, 1973
JAEGER, O.
118. MELNICK, J.L. Classification and Nomenclature of Ani-
Mc COMBS, R.M. mal Viruses.
Progr.med.Virol. 8, 400, 1966
119. MIYAMOTO, K. Comparative studies between pathogenesis
MATSUMOTO, S. of street and fixed rabies infection.
J.exp.Med. 125, 447-456, 1967
120. MÖBEST, H. Prüfung des Tollwutimpfstoffes nach
Hempt im Habel-Test.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 173, 345-351, 1958

121. MOZAR, H.N. Myelopathy After Duck Embryo Rabies
FINNIGAN, F.B. Vaccine.
PETZOLD, H. J.Amer.med.Ass. 224, 1605-1607, 1973
SPITLER, L.E.
EMMONS, R.W.
ROTHENBERG, B.
122. NETTO, A.R. Comparative Study of Cattle Antirabies
NILSON, M.R. Vaccines.
DE ANGELIS CORTEZ, J. II. Protection conferred by Alurabiffa,
MIZUNO, M. ERA and Formidogel Vaccines.
MIGUEL, O. Zbl.Vet.Med. B20, 398-404, 1973
123. NEURATH, A.R. The rabies virus glycoprotein:
VERNON, S.K. partial purification and some properties.
WIENER, F.P. Microbios, 7, 7-15, 1973
HARTZELL, R.W.
RUBIN, B.A.
124. NIKOLITSCH, M. Biologische Wirksamkeitsprüfungen der
antirabischen Vakzine.
Wien.tierärztl.Mschr. 51, 46-50, 1964
125. OTT, G.L. Propagation of Rabies Virus;
HEYKE, B. Evaluation of a Vaccine.
Vet.Med. 57, 613-616, 1962
126. OTT, G.L. Preliminary Trials of New Tissue Culture
HEYKE, B. Rabies Vaccine.
Vet.Med. 57, 158-159, 1962
127. OTT, G.L. Hamster Cell Culture Rabies Vaccine.
Vet.Med.Small Anim.Clin. 61, 452-454, 1966
128. OTT, G.L. Hamster Cell Culture Rabies Vaccines.
Proc.Nat.Rabies Symp.NCDC, Atlanta,
Georgia, May 5-6 : 52, 1966

129. PECK, F.B., Jr. A New Antirabies Vaccine for Human Use.
POWELL, H.M. J.Lab.clin.Med. 45, 679-683, 1955
CULBERTSON, G.G.
130. PECK, F.B., Jr. Duck-Embryo Rabies Vaccine.
POWELL, H.M. J.Amer.med.Ass. 162, 1373-1376, 1956
CULBERTSON, G.G.
131. PETERMANN, H.G. Un nouveaux vaccin antirabique préparé
LANG, R. avec du virus fixe produit sur culture
BRANCHE, R. de cellules et inactive.
SOULEBOT, J.P. Rapports XVIII^{ème} Congr.Mond.Vet.Paris
227-230, 1967
132. PETROVIC, M. Die Schädliche Wirkung des Formaldehyds
auf die immunologische Wirksamkeit des
Tollwut-Impfstoffes nach Hempt.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 224, 422-427, 1973
133. PLOTLIN, S.A. Prevention of rabies in man.
CLARK, H.F. J.infect.Dis. 123, 227-240, 1971
134. RAUCHENBERGER, P. Die Tollwut - Zur Epidemiologie und Pro-
phylaxe.
Münch.med.Wschr. 115, 1497-1502, 1973
135. REED, L.J. A Simple Method of Estimating Fifty Per
MUNICH, H. Cent End-points.
Amer.J., Hyg. 27, 493-497, 1938
136. RISLAKKI, V. On the properties of Finnish antirabies
vaccine.
State Veterinary Medical Institute,
Helsinki, 1957
137. RUBIN, R.H. Adverse Reactions to Duck Embryo Rabies
HATWICK, M.A.W. Vaccine.
JONES, S. Ann.Intern.Med. 78, 643-649, 1973
GREGG, M.B.
SCHWARTZ, V.D.

138. SCHINDLER, R. Untersuchungen über die Grundlagen der
 aktiven Immunität gegen Tollwut.
 Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 188, 311-322, 1963
139. SCHLUMBERGER, H.D. Antigenic and immunogenic properties of
 WIKTOR, T.J. components contained in rabies virus
 KOPROWSKI, H. infected tissue culture fluids.
 J.Immunol. 105, 291-298, 1970
140. SCHNEIDER, L.G. Purification of Rabies Virus from Tissue
 HORZINEK, M. Culture.
 MATHEKA, H.D. Arch.ges.Virusforsch. 34, 351-359, 1971
141. SCHNEIDER, L.G. Isolation of a Hemagglutinating, Immuni-
 HORZINEK, M. zing, and Non-Infectious Subunit of the
 NOVICKY, R. Rabies Virion.
 Arch.ges.Virusforsch. 34, 360-370, 1971
142. SCHNEIDER, L.G. Neuere Entwicklung bei Tollwutvaccinen.
 Fortschritte der Veterinärmedizin.
 Heft 17: 9.Kongressbericht, 114-121, 1972
143. SCHNEIDER, L.G. Rabies Group-Specific Ribonucleoprotein
 DIETZSCHOLD, B. Antigen and a Test System for Grouping
 DIERKS, R.E. and Typing of Rhabdoviruses.
 MATTHAEUS, W. J.Virol. 11, 748-755, 1973
 ENZMANN, P.J.
 STROHMAIER, K.
144. SCHNEIDER, L.G. Klassifizierung von Rhabdoviren durch
 Nachweis der gruppenspezifischen Antigene.
 Zbl.Bakt., I.Abt.Ref. 223, 18, 1973
145. SCHNEIDER, L.G. Cell Monolayer Plaque Test.
 Laboratory Techniques in Rabies, Genf,
 3rd.edition, WHO Monograph Series No.23,
 339-342, 1973

146. SCHOOP, G. Aktuelle Probleme der Tollwut.
WACHENDÖRFER, G. Zbl.Bakt.,I.Orig.,Suppl.3, 1970
LINZENMEIER, G.
KUWERT, E.
147. SCHWAB, M.P. Avianized Rabies Virus Vaccination in
FOX, J.P. Man.
CONWELL, D.P. Bull.Wld Hlth Org. 10, 823-835, 1954
ROBINSON, T.A.
148. SEDWICK, W.D. Reproducible Plaquing System for Rabies,
WIKTOR, T.J. Lymphocitic Choriomeningitis, and Other
Ribonucleic Acid Viruses in BHK-21 / 13S
Agarose Suspensions.
J.Virol: 1, 1224-1226, 1967
149. SELIGMANN, E.B.,Jr. Potency-Test Requirements of the United
States National Insitutes of Health (NIH).
Laboratory Techniques in Rabies,Genf,
2nd.edition,WHO Monograph Series No.23,
145-151, 1966
150. SELIGMANN, E.B.,Jr. The NIH Test for Potency.
Laboratory Techniques in Rabies,Genf,
3rd.edition,WHO Monograph Series No.23,
279-286, 1973
151. SELIMOV, M.A. A lyophilized phenol rabies vaccine for
use in medical practice.
J.Microbiol.,Epidemiol.,Immunol.
32, 835-840, 1960
152. SELIMOV, M.A. Interference in Tissue Cultures Induced
CHUPRIKOVA, M. by Rabies Virus.
KALININA, L. Acta Virol. 9, 445-448, 1965
SHAROVA, Z.

153. SELIMOV, M.A.
AKSENOVA, T.A. Tissue culture rabies vaccine for human use.
Int.Symp.on Rabies,Talloires.Series
Immunobiol.Standard. 1,377-380, 1966
154. SELIMOV, M.A.
KLJUEVA, E.V. Method to determine the immunogenic activity of rabies vaccine with street virus of rabies in mice.
Vet.Caš.(Kosice) 123-126, 1969
155. SIKES, R.K.
LARGHI, O.P. purified rabies vaccine: development and comparison of potency and safety with two human rabies vaccines.
J.Immunol. 99, 545-553, 1967
156. SIKES, R.K.
CLEARY, W.F.
KOPROWSKI, H.
WIKTOR, T.J.
KAPLAN, M.M. Effective Protection of Monkeys Against Death from Street Virus by Post-Exposure Administration of Tissue-Culture Rabies Vaccine.
Bull.Wld Hlth Org. 45, 1-11, 1971
157. SMITH, J.S.
YAGER, P.A.
BAER, G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody.
Bull.Wld Hlth Org. 48, 535-541, 1973
158. SOKOL, F.
KUWERT, E.
WIKTOR, T.J.
HUMMELER, K.
KOPROWSKI, H. Purification of Rabies Virus Grown in Tissue Culture.
J.Virol. 2, 836-849, 1968
159. SOKOL, F.
KUWERT, E.
WIKTOR, T.J.
KOPROWSKI, H.
HUMMELER, K. Purification of rabies virus-infected tissue culture fluids.
J.Immunol. 105, 291-298, 1968

160. SOKOL, F. Some properties of purified rabies virus
KUWERT, E. preparations.
WIKTOR, T.J. Bact.Proc. 68, 151, 1968
HUMMELER, K.
KOPROWSKI, H.
161. SOKOL, F. Nucleocapsid of rabies virus.
HUMMELER, K. Bact.Proc. 69, 177, 1969
SCHLUMBERGER, H.D.
WIKTOR, T.J.
KOPROWSKI, H.
162. SOKOL, F. Structural proteins of rabies virus.
STANCEK, D. J.Virol. 7, 241-249, 1971
KOPROWSKI, H.
163. SOULEBOT, J.P. Etude Comparative des Methods de
LANG, R. Controle des Vaccines Antirabiques
BRANCHE, R. Inactives.
PETERMANN, H.G. unveröffentlich, 1967
164. STECK, F. Neuere Ergebnisse der Tollwutforschung.
Path.Microbiol. 38, 50-63, 1972
165. STECK, K. Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpf-
stoffen.
3.Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch mit
einmaliger Immunisierung.
Z.Immun.-forsch. 125, 17-29, 1963
166. STECK, K. Zur Wirksamkeitsprüfung von Tollwutimpf-
stoffen.
4.Mitteilung: Der Mäuseschutzversuch mit
zweimaliger Immunisierung.
Z.Immun.-forsch. 125, 30-36, 1963
167. STILIE, W. Tollwutimpfung mit Entenseivakzine.
HELM, E.B. Zbl.Bakt., I.Abt.Orig., Suppl. 3, 29-101, 1970

168. SVET-MOLDAVSKIJ, G.JA, ANDJAPARIDZE, O.G., UNANOV, S.S.,
KARAKAJUMCAN, M.K., SVET-MOLDAVSKAJA, I.A., MUCNIK, L.S.,
HIENINSON, M.A., RAVKINA, L.I., MTVARELIDZE, A.A.,
VOLKOVA, O.F., KRIEGSHABER, M.R., KALINKINA, A.G., SALITA, T.V.,
KLIMOVICKAJA, V.I., BONDALETOVA, I.N., ROJHEL, V.M.,
KISELEVA, I.S., LEVCENKO, E.N., MARENNIKOVA, S.S.,
LEONIDOVA, S.L.
An Allergen-Free Antirabies Vaccine.
Bull.Wld Hlth Org. 32, 47-58, 1965
169. SWEET, B.H.
Biological Standards for Tissue Culture
Vaccines for Rabies.
Int.Symp.on Rabies, Talloires, Series
Immunobiol.Standard. 1, 391-396, 1966
170. SZIEGOLEIT, A.
GERTH, H.J.
Bestimmung von Rabiesantikörpern nach
Schutzbehandlung mit einem Interferenztest.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 218, 24-31, 1971
171. TIMM, H.
WOLTER, M.
Elektroencephalographische Untersuchungen
im Verlauf von Tollwutschutzimpfungen
nach Hempt.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 2108, 1970
172. TIMM, H.
Komplikationen der Wutschutzbehandlung.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 2135, 1970
173. TURNER, G.S.
KAPLAN, G.
Some properties of fixed rabies virus.
J.gen.Virol. 1, 537-551, 1967
174. TURNER, G.S.
Rabies vaccines.
Brit.Med.Bull. 25, 136, 1969
175. TURNER, G.S.
Humoral and Cellular Immune Responses of
Mice to Rabies and Smallpox Vaccines.
Nature New Biology 241, 90-92, 1973

176. U.S. NATIONAL Minimum Requirements:
INSTITUTES OF Rabies Vaccine.
HEALTH, BETHESDA, (Feb. 3, 1953)
MARYLAND, USA.
177. UNITED STATES Standard Requirement for Rabies Vaccine,
DEPARTMENT OF Inactivated Virus.
AGRICULTURE February 1, 1973
(U.S.D.A.)
178. VEERARAGHAVAN, N. Antigenic Value of Lyophilized Phenolized
SUBRAHMANYAN, T.P. Antirabies Vaccine.
Bull. Wld Hlth Org. 25, 115-117, 1961
179. VERNON, S.K. Electron Microscopic Studies on the Struc-
NEURATH, A.R. ture of Rabies Virus.
RUBIN, B.A. J. Ultrastruc. Res. 41, 29-42, 1972
180. VIEUCHANGE, J. Affinity of the fixed rabies virus for
BEQUIGNON, R. the cells of renal origin cultivated in
GUEST, J. vivo.
VIALAT, C. Bull. Acad. Nat. Med. (Paris) 140, 77, 1956
181. VIVELL, O. Erfahrungen mit der Tollwutschutzimpfung
SCHNITZKE, H. nach Hempt.
JAEGER, O. Arch. Kinderheilk. 179, 145-154, 1969
BARTH, R.
HENNESSEN, W.
182. WACHENDÖRFER, G. Die Präinfektionelle Wutschutzimpfung
bei Haustieren im Lichte neuerer For-
schungsergebnisse.
Wien. tierärztl. Mschr. 57, 51-61, 1970
183. WEBSTER, L.T. A Mouse Test for Measuring the Immunizing
Potency of Antirabies Vaccines.
J. exp. Med. 70, 87-106, 1939

184. W.H.O. WHO Expert Committee on Biological
Standardization:
Wld.Hlth Org.techn.Rep.Ser., 274, 16, 1954
185. W.H.O. WHO Expert Committee on Biological
Standardization:
Wld.Hlth Org.techn.Rep.Ser., 329, 15, 1966
186. W.H.O. WHO Expert Committee on Rabies:
Sixth Report.
Wld.Hlth Org.techn.Rep.Ser. 523, 1973
187. W.H.O. Laboratory Techniques in Rabies, Genf,
3rd.edition, WHO Monograph Series No.23,
1973
188. WIKTOR, T.J. Cultivation of Rabies Virus in Human
FERNANDES, M.V. Diploid Cell Strain WI - 38.
KOPROWSKI, H. J.Immunol. 93, 353-366, 1964
189. WIKTOR, T.J. Successfull Immunization of Primates
KOPROWSKI, H. with Rabies Vaccines Prepared in Human
Diploid Cell Strain WI - 38.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 118, 1069-1073,
1965
190. WIKTOR, T.J. Kinetics of Rabies Virus Growth in Tissue
Culture.
Proc.Nat.Rabies Symp.NCDC, Atlanta,
Georgia, May 5-6: 9-14, 1966
191. WIKTOR, T.J. Dynamics of Rabies Virus Infection in
Tissue Culture.
Int.Symp.on Rabies, Talloires, Series
Immunobiol.Standard. 1, 65-80, 1966
192. WIKTOR, T.J. Immunogenicity of Concentrated and Puri-
SOKOL, F. fied Rabies Vaccine of Tissue Culture
KUWERT, E. Origin.
KOPROWSKI, H. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 131, 799-805, 1969

193. WIKTOR , T.J. Inhibitory Effect of Passive Antibody
LERNER, R.A. on Active Immunity Induced Against
KOPROWSKI, H. Rabies by Vaccination.
Bull.Wld Hlth Org. 45, 747-755, 1971
194. WIKTOR, T.J. Role of Interferon Induction in the
POSTIC, B. Protective Activity of Rabies Vaccines.
HO, M. J.infect.Dis. 126, 408-418, 1972
KOPROWSKI, H.
195. WIKTOR, T.J. Immunogenicity of Rabies Virus Inacti-
AASLESTAD, H.G. vated by β -Propiolactone, Acetylene-
KAPLAN, M.M. imine, and Ionizing Irradiation.
Appl.Microbiol. 23, 914-918, 1972
196. WIKTOR, T.J. Antigenic Properties of Rabies Virus
GYÖRGY, H.D. Components.
SCHLUMBERGER, H.D. J.Immunol. 110, 269-276, 1973
SOKOL, F.
197. WIKTOR, T.J. Comparison of Rabies Virus Strains by
CLARK, H.F. Means of the Plaque Reduction Test.
Ann.Microbiol. 124A, 283-287, 1973
198. WIKTOR, T.J. Application of the Plaque Technique
CLARK, H.F. to the Study of Rabies Virus-Neutralizing
Antibody Interactions.
Ann.Microbiol. 124A, 271-281, 1973
199. WIKTOR, T.J. Human Cell Culture Rabies Vaccine,
PLOTKIN, S.A. Antibody Response in Man.
GRELLA, D.W. J.Amer.med.Ass. 224, 1170-1171, 1973
200. WÖHLE, W. Zur Wirksamkeit der Tollwutvaccine nach
HEMPT beim Hund.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr.78, 470-472, 1965
201. ZUNKER, M. Untersuchungen über einen Tollwutimpf-
BULLING, E. stoff nach Hempt.
Arch.exp.Vet.-Med. 12, 6-28, 1958

VII. A n n a h e

Tabelle 1 : Prüfung einer Tollwutvaccine nach HEMPT (Op.Nr.526) im Habel-Test und Berechnung des Schutzwertes.

Verd. des Belastungs-virus	immunisiert mit 6 x 0,25 ml HEMPT 1 : 14 i.p.						Kontrollen			
	überle-bende	Tollwut-positive	kumulierte Zahlen		Mortali-tät (%)	überle-bende	Tollwut-positive	kumulierte Zahlen		Mortali-tät (%)
			überleb.	Tollw. pos.				überleb.	Tollw. pos.	
10 ⁻¹	1	9	1	23	96	-	-	-	-	-
10 ⁻²	2	8	3	14	82	-	-	-	-	-
10 ⁻³	7	3	10	6	38	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	8	2	18	3	14	0	10	0	30	100
10 ⁻⁵	9	1	27	1	4	1	9	1	20	95
10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	0	9	1	11	92
10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	6	2	7	2	22
log.LD ₅₀ HEMPT-Vaccine =						log.LD ₅₀ Kontrollen =				
3 - $\frac{50 - 38}{82 - 38} = 2,7$						7 - $\frac{50 - 22}{92 - 22} = 6,6$				

log.Schutzwert HEMPT-Vaccine = 6,6 - 2,7 = 3,9

Schutzwert = 10^{3,9} LD₅₀

Tabelle 2 : Ergebnisse der Prüfung von Tollwutvaccinen nach Hempt
im Habel-Test

Vaccine Op.Nr.	526	520	534	516	516
$\log LD_{50} - K = \log d. 50\% \text{ Endpunktes}$ bei Kontrolltieren	6,6	5,1	5,1	5,0	6,5
$\log LD_{50} - V = \log d. 50\% \text{ Endpunktes}$ bei vacc.Tieren	2,7	2,8	1,6	2,3	3,6
$\log \text{ des Schutzwertes}$	3,9	2,3	3,5	2,7	2,9

Tabelle 3 : Ergebnisse der Prüfung von Zellkultur-Versuchsvaccinen im Habel-Test

Vaccine Op.Nr.	Substand. vacc. A 18 1 : 80	HTW 35	HTW 36	HTW 37	GTW 133a	GTW 134a	GTW 54a	GTW 56a	GTW 56a
log LD ₅₀ - K	5,9	6,6	5,1	5,1	5,1	5,11	5	6,5	5
log LD ₅₀ - V	1,4	2,7	2,7	1,4	2,1	1,26	<1	<1	<1
log des Schutz- wertes	4,5	3,9	2,4	3,7	3,0	3,85	>4	>5,5	>4

Tabelle 4 : Prüfung der Gewebekultur-Vaccine GTW 54 a im N.I.H.-Test und Berechnung des Schutzwertes nach der volumetrischen Methode.
Die Belastung erfolgte mit 19 LD₅₀.

Testvaccine

Vaccine-verd.	überlebende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
			überleb.	Tollw. pos.	
1:5	16	0	49	0	100
1:25	16	0	33	0	100
1:125	13	2	17	2	89
1:625	4	9	4	11	27

$$- \log. ED_{50} \text{ Testvaccine} =$$

$$2,0969 + \frac{89 - 50}{89 - 27} \times 0,699 = 2,5366$$

$$\text{Verdünnung } ED_{50} \text{ der Testvaccine} =$$

$$1: 344$$

Substandardvaccine A 18

Vaccine-verd.	überlebende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
			überleb.	Tollw. pos.	
1:5	16	0	51	0	100
1:25	14	2	35	2	95
1:125	13	3	21	5	81
1:625	8	8	8	13	38

$$- \log. ED_{50} \text{ der Substandardvaccine} =$$

$$2,0969 + \frac{81 - 50}{81 - 38} \times 0,699 = 2,6008$$

$$\text{Verdünnung } ED_{50} \text{ der Substandardvaccine} =$$

$$1: 399$$

$$\text{Antigenitätswert der Testvaccine} = \frac{344}{399} =$$

$$0,86$$

Tabelle 5 : Ergebnisse der Prüfung von Tollwutvaccinen im N.I.H.-Test
Bestimmung der ED₅₀ nach der volumetrischen Methode.

Test-reihe	Vaccine	Belastungs-dosis(LD ₅₀)	ED ₅₀	A.V.
I	N.I.H.-Referenz-vaccine Lot 176	19	1:261	1,00
	Substand.vacc. A 18	19	1:193	0,74
II	Substand.vacc. A 18	>100	1:511	1,00
	Hempt-Vacc. Op.Nr.526	>100	1:96	0,19
	HTW 35	>100	1:23	0,05
III	Substand.vacc. A 18	3	>1:625	1,00
	Hempt-Vacc. Op.Nr.520	3	1:174	<0,28
	HTW 36	3	1:358	<0,57
	HTW 37	3	1:557	<0,89
IV	Substand.vacc. A 18	12	1:264	1,00
	Hempt-Vacc. Op.Nr.534	12	1:79	0,3
	GTW 133 a	12	1:47	0,18
	GTW 134 a	12	1:78	0,3
V	Substand.vacc. A 18	19	1:398	1,00
	Hempt-Vacc. Op.Nr.516	19	1:13	0,03
	GTW 54 a	19	1:344	0,86
	GTW 56 a	19	1:206	0,52
VI	Substand.vacc. A 18	18	1:296	1,00
	GTW 54 a	18	1:286	0,97
	GTW 56 a	18	1:242	0,82
VII	Substand.vacc. A 18	8	1:270	1,00
	Hempt-Vacc. Op.Nr.516	8	1:27	0,1
	GTW 54 a	8	1:462	1,7
	GTW 56 a	8	>1:625	>2,46

Tabelle 6 : Bestimmung des Antigenitätswertes der Hempt-Vaccine Op.Nr.534 im N.I.H.-Test.
Berechnung der ED₅₀ nach der gravimetrischen Methode. (Belastungsdosis 12 ID₅₀).

Hempt-Vaccine Op.Nr.534 (7% Gehirnsuspension).

Vacc. verd.	Nerven- gew. (mg)	Anzahl d. Mäuse	überle- bende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		Morta- lität (%)
					über- leb.	Tollw. pos.	
1:5	14	16	13	2	26	2	7
1:25	2,8	16	8	5	13	7	35
1:125	0,56	16	2	13	5	20	80
1:625	0,112	16	3	11	3	31	94

$$ED_{50} = \text{Antilog} \left(\frac{80 - 50}{80 - 35} \times \log 5 \right) \times 0,56 = \text{Antilog } 0,466 \times 0,56 \text{ mg} = 2,924 \times 0,56 \text{ mg} = 1,64 \text{ mg}$$

Substandardvaccine A 18 (10% Gehirngewebesuspension).

Vacc. verd.	Nerven- gew. (mg)	Anzahl d. Mäuse	überle- bende	Tollw. pos	kumulierte Zahlen		Morta- lität (%)
					über- leb.	Tollw. pos.	
1:5	20	16	16	0	47	0	0
1:25	4	16	14	2	31	2	6
1:125	0,8	16	10	6	17	8	32
1:625	0,16	16	7	9	7	17	71

$$ED_{50} = \text{Antilog} \left(\frac{71 - 50}{71 - 32} \times \log 5 \right) \times 0,16 = \text{Antilog } 0,3764 \times 0,16 \text{ mg} = 2,379 \times 0,16 \text{ mg} = 0,38 \text{ mg}$$

$$\text{Antigenitätswert} = \frac{0,38}{1,64} = 0,23$$

Tabelle 7 : Ergebnisse der Bestimmung der Antigenitätswerte von Hempt-Vaccinen und Substandardvaccine A 18 im N.I.H.-Test nach der gravimetrischen und nach der volumetrischen Methode.

Vers.-reihe	Vaccine	gravimetrische Methode (Nervengewebe Anteil in mg)		volumetrische Methode (Verdünnung)		LD ₅₀
		ED ₅₀	AV	ED ₅₀	AV	
I	Substand.vacc.A 18	0,71	0,54	1:193	0,74	19
	N.I.H.-Referenzvaccine Lot 176	0,38	1,00	1:261	1,00	19
II	Substand.vacc.A 18	0,27	1,00	1:511	1,00	>100
	Hempt-Vaccine Op.Nr.526	1,14	0,24	1:96	0,19	>100
III	Substand.vacc.A 18	<0,16	1,00	>1:625	1,00	3
	Hempt-Vaccine Op.Nr.520	0,15	<1,07	1:174	<0,28	3
IV	Substand.vacc.A 18	0,38	1,00	1:264	1,00	12
	Hempt-Vaccine Op.Nr.534	1,64	0,23	1:79	0,3	12
V	Substand.vacc.A 18	0,25	1,00	1:398	1,00	19
	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	5,33	0,05	1:13	0,03	19
VI	Substand.vacc.A 18	0,37	1,00	1:270	1,00	8
	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	2,57	0,14	1:27	0,1	8

Tabelle 8 : Prüfung von Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit je 6 Mäusen/Vaccineverdünnung unter Verwendung der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 als Standardvaccine und Berechnung des Antigenitätswertes. (Tollwutviruszusatz 50 LD₅₀)

Vaccine A 18

Vacc.-verd.	Anzahl d. Mäuse	überlebende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
				überleb.	Tollw. pos.	
1:2	6	0	6	0	39	0
1:4	6	0	6	0	33	0
1:8	6	0	6	0	27	0
1:16	6	0	6	0	21	0
1:32	6	1	5	1	15	6
1:64	6	1	5	2	10	17
1:128	6	2	4	4	5	44
1:256	6	5	1	9	1	90

$$\log. AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 2,1072 + \frac{90 - 50}{90 - 44} \times 0,3010 = 2,3689$$

$$AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1 : 233,9$$

N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180

Vacc.-verd.	Anzahl d. Mäuse	überlebende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
				überleb.	Tollw. pos.	
1:2	6	0	6	0	34	0
1:4	6	0	6	0	28	0
1:8	6	1	5	1	22	4
1:16	6	0	6	1	17	6
1:32	6	2	4	3	11	21
1:64	6	3	3	6	7	46
1:128	6	3	3	9	4	69
1:256	6	5	1	14	1	93

$$\log. AD_{50} \text{ N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180} = 1,8062 + \frac{69 - 50}{69 - 46} \times 0,3010$$

$$= 2,0549$$

$$AD_{50} \text{ N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180} = 1 : 113,5$$

$$\text{Antigenitätswert Testvaccine A 18} = \frac{233,9}{113,5} = 2,06$$

Tabelle 9 : Prüfung der Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit je 8 Mäusen/Vaccineverdünnung unter Verwendung der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 als Standardvaccine und Berechnung des Antigenitätswertes (Tollwutviruszusatz 32 LD₅₀)

Vaccine A 18

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überle- bende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überle- bende (%)
				über- leb.	Tollw. pos.	
1:2	8	0	8	0	57	0
1:4	8	0	8	0	49	0
1:8	8	0	8	0	41	0
1:16	8	0	8	0	33	0
1:32	8	0	8	0	25	0
1:64	8	0	8	0	17	0
1:128	8	0	8	0	9	0
1:256	8	7	1	7	1	88

$$\log. AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 2,1072 + \frac{88 - 50}{88 - 0} \times 0,3010 = 2,2372$$

$$AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1 : 172,9$$

N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überle- bende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überle- bende (%)
				über- leb.	Tollw. pos.	
1:2	8	0	8	0	46	0
1:4	8	0	8	0	38	0
1:8	8	0	8	0	30	0
1:16	8	0	8	0	22	0
1:32	8	1	7	1	14	7
1:64	8	3	5	4	7	36
1:128	8	6	2	10	2	83
1:256	8	8	0	18	0	100

$$\log. AD_{50} \text{ N.I.H.-Ref.vacc.Lot 180} = 1,8062 + \frac{83 - 50}{83 - 36} \times 0,3010 = 2,0175$$

$$AD_{50} \text{ N.I.H.-Ref.vacc. Lot 180} = 1 : 104,1$$

$$\text{Antigenitätswert Testvaccine A 18} = \frac{172,9}{104,1} = 1,66$$

Tabelle 10 : Prüfung von Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit je 10 Mäusen/Vaccineverdünnung unter Verwendung der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 als Standardvaccine und Berechnung des Antigenitätswertes (Tollwutviruszusatz 50 LD₅₀)

Vaccine A 18

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überlebende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
				überleb.	Tollw. pos.	
1:2	10	0	10	0	63	0
1:4	10	0	10	0	53	0
1:8	10	0	10	0	43	0
1:16	10	0	10	0	33	0
1:32	10	2	8	2	23	8
1:64	10	3	7	5	15	25
1:128	10	7	3	12	8	60
1:256	10	6	3	18	5	78
1:512	10	7	2	25	2	93

$$\log. AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1,8062 + \frac{60 - 50}{60 - 25} \times 0,3010 = 1,8922$$

$$AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1 : 78,02$$

N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überlebende	Tollw. pos	kumulierte Zahlen		überlebende (%)
				überleb.	Tollw. pos.	
1:2	10	0	10	0	50	0
1:4	10	0	10	0	40	0
1:8	10	0	10	0	30	0
1:16	10	0	10	0	20	0
1:32	10	4	6	4	10	29
1:64	10	8	2	12	4	75
1:128	10	8	2	20	2	91
1:256	10	10	0	30	0	100

$$\log. AD_{50} \text{ N.I.H.-Ref.vacc. Lot 180} = 1,5052 + \frac{75 - 50}{75 - 29} \times 0,3010 = 1,6688$$

$$AD_{50} \text{ N.I.H.-Ref.vacc. Lot 180} = 1 : 46,64$$

$$\text{Antigenitätswert Testvaccine A 18} = \frac{78,02}{46,64} = 1,67$$

Tabelle 11 : Prüfung von Vaccine A 18 im Antikörperbindungstest mit je 16 Mäusen/Vaccineverdünnung unter Verwendung der N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180 als Standardvaccine und Berechnung des Antigenitätswertes (Tollwutviruszusatz 50 LD₅₀)

Testvaccine A 18

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überle- bende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überle- bende
				über- leb.	Tollw. pos.	
1:2	16	0	16	0	102	0
1:4	16	0	16	0	86	0
1:8	16	0	16	0	70	0
1:16	16	0	16	0	54	0
1:32	16	3	13	3	38	7
1:64	16	4	12	7	25	22
1:128	16	9	7	16	13	55
1:256	16	11	4	27	6	82
1:512	16	14	2	41	2	95

$$\log. AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1,8062 + \frac{55 - 50}{55 - 22} \times 0,3010 = 1,8518$$

$$AD_{50} \text{ Vaccine A 18} = 1 : 71,09$$

N.I.H.-Referenzvaccine Lot 180

Vacc. verd.	Anzahl d.Mäuse	überle- bende	Tollw. pos.	kumulierte Zahlen		überle- bende (%)
				über- leb.	Tollw. pos.	
1:2	16	0	16	0	89	0
1:4	16	0	16	0	73	0
1:8	16	1	15	1	57	2
1:16	16	0	16	1	42	2
1:32	16	6	10	7	26	21
1:64	16	11	5	18	16	53
1:128	16	11	5	29	11	73
1:256	16	10	5	39	6	87
1:512	16	15	1	54	1	98

$$\log. AD_{50} \text{ N.I.H.-Ref.vacc.Lot 180} = 1,5052 + \frac{53 - 50}{53 - 21} \times 0,3010 = 1,5340$$

$$\text{Antigenitätswert Testvaccine A 18} = \frac{71,09}{34,02} = 2,08$$

Tabelle 12 : Prüfung von Tollwutvaccinen im Antikörperbindungstest mit Vaccine A 18
als Standardvaccine.

Lfd. Nr.	Anzahl d. Mäuse	Virus Zusatz LD ₅₀	Hempt-Vaccine Op. Nr. 516		GTW 54 a		GTW 56 a		Substandard- vaccine A 18	
			AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV
1.	6	10	2,59	0,02	9,03	0,09	-	-	103,8	1,00
2.	6	10	2,58	0,02	8,79	0,08	13,06	0,11	113,6	1,00
3.	6	7	6,78	0,18	28,71	0,74	12,31	0,32	38,57	1,00
4.	6	8	4,94	0,13	28,51	0,73	4,49	0,12	38,6	1,00
5.	6	251	16,36	<0,06	128	<0,5	64	<0,4	>256	1,00
6.	6	6	3,1	0,03	10,15	0,11	8	0,09	90,51	1,00
7.	6	36	12,7	0,4	27	0,84	50,8	1,59	32	1,00
8.	6	4,4	<2	<0,05	23,77	0,54	16	0,37	43,76	1,00
9.	8	15	4,25	0,04	9,37	0,07	27,85	0,24	118	1,00
10.	10	15	4,67	0,06	46,71	0,62	49,74	0,66	75,34	1,00
11.	6	15	-	-	19,95	0,26	-	-	75,34	1,00
12.	16	15	-	-	59,84	0,79	-	-	75,34	1,00
13.	10	50	8,58	0,11	50,8	0,65	118,9	1,52	78,02	1,00
14.	6	50	18,62	0,08	108,5	0,46	115,9	0,5	233,9	1,00
15.	16	50	12,43	0,17	40,32	0,57	64	0,9	71,09	1,00
16.	8	32	29,78	0,17	213,7	1,23	44,39	0,26	172,9	1,00
17.	6	32	-	-	193,3	1,12	-	-	172,9	1,00
18.	14	32	-	-	128	0,74	-	-	172,9	1,00

Tabelle 13 : Prüfung von Tollwutvaccinen im Antikörperbindungstest mit N.I.H.-
Referenzvaccine Lot 180 als Standardvaccine.

Lfd. Nr.	Anzahl d. Mäuse	Virus Zusatz LD ₅₀	Hemph-Vaccine Op. Nr. 516		GTW 54 a		GTW 56 a		A 18		N.I.H.- Refe- renzvaccine Lot 180	
			AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV	AD ₅₀	AV
1.	10	50	8,58	0,18	50,8	1,09	118,9	2,54	78,02	1,67	46,64	1,00
2.	6	50	18,62	0,16	108,5	0,87	115,9	1,02	233,9	2,06	113,5	1,00
3.	16	50	12,43	0,36	40,32	1,18	64	1,87	71,09	2,08	34,17	1,00
4.	8	32	29,78	0,29	213,7	2,05	44,39	0,43	172,9	1,66	104,1	1,00
5.	6	32	-	-	193,3	1,86	-	-	-	-	104,1	1,00
6.	14	32	-	-	128	1,23	-	-	-	-	104,1	1,00

Tabelle 14 : Bestimmung der Antigenitätswerte verschiedene Tollwutvaccinen im Antikörperbindungstest mit Vaccine A 18 als Substandard und N.I.H.-Referenzvaccine
Lot 180 als Standardvaccine.

Versuchsreihe	Vaccine	AV-Bestimmung mit Vaccine A 18 als Substandard	AV-Bestimmung mit N.I.H.-Referenz- vaccine Lot 180 als Standard
I	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	0,11	0,18
	GTW 54 a	0,65	1,09
	GTW 56 a	1,52	2,52
II	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	0,08	0,16
	GTW 54 a	0,46	0,87
	GTW 56 a	0,50	1,02
III	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	0,17	0,36
	GTW 54 a	0,57	1,18
	GTW 56 a	0,90	1,87
IV	Hempt-Vaccine Op.Nr.516	0,17	0,29
	GTW 54 a	1,23	2,05
	GTW 54 a	1,12	1,86
	GTW 54 a	0,74	1,23
	GTW 56 a	0,26	0,43

Tabelle 15 : Prüfung von Tollwutvaccinen im Habel-, N.I.H.- und Antikörperbindungstest

Vaccine	Habel-Test log des Schutz- wertes	N.I.H.-Test (mit Vaccine A 18 als Substandard) A.V.	Antikörperbindungstest : A.V.	
			Vacc.A 18 als Substandard	N.I.H.-Referenzvacc. Lot 180 als Standard
A 18	4,5 (1:80 = 0,125% Gehirnanteil)			1,67 2,06 2,08 1,66
GTW 54 a	>4 >5,5	0,86 0,97 1,71	0,09 0,08 0,74 0,73 0,11 0,84 0,07 0,62 0,26	
			0,65 0,46 0,57 1,23 1,12	1,09 0,87 1,86 2,05
GTW 56 a	>4 >5,5	0,52 0,82 >2,46	0,11 0,32 0,12 0,09 1,59 0,24 0,66	
			1,52 0,50 0,90 0,26	2,54 1,02 1,87 0,43

Hempt-Vaccine Op.Nr. 516	2,7 2,9		0,03 0,10	0,02 0,02 0,18 0,13 0,03 0,40 0,04 0,06	
				0,11 0,08 0,17 0,17	0,18 0,16 0,36 0,29
Hempt-Vaccine Op.Nr. 526	3,9		0,19 1)		
Hempt-Vaccine Op.Nr. 520	2,3		<0,28 2)		
Hempt-Vaccine Op.Nr. 534	3,5		0,30		
HTW 35	3,9		0,05 1)		
HTW 36	2,4		<0,57 2)		
HTW 37	3,7		<0,89 2)		
GTW 133 a	3,0		0,18		
GTW 134 a	3,9		0,30		

1) Belastung > 100 LD₅₀

2) Belastung 3 LD₅₀

Tabelle 16 : Antikörperbindungstests mit Unregelmäßigkeiten in der Mortalitätsrate.

Verd.	Hempt-Vaccine Op.Nr.516		Hempt-Vaccine Op.Nr.516		GTW 54 a		GTW 54 a		GTW 56 a		Vaccine A 18	
	über- leb.	TW.- pos.	über- leb.	TW.- pos.	über- leb.	TW.- pos.	über- leb.	TW.- pos.	über- leb.	TW.- pos.	über- leb.	TW.- pos.
1:2	1	5	2	4	1	4	4	2	4	2	2	4
1:4	2	4	4	2	3	2	3	3	2	4	1	5
1:8	4	1	2	4	1	5	0	5	1	3	1	5
1:16	1	5	2	4	4	2	2	3	4	2	0	6
1:32	5	1	5	1	3	3	5	1	3	3	2	4
1:64	5	1	5	1	6	0	5	1	4	1	3	3
1:128	4	2	5	1	5	1	6	0	6	0	5	1
1:256	4	2	4	2	6	0	6	0	3	1	6	0

Abbildung 1 : Prüfung der Hempt-Vaccine Op.Nr.526 im Habel-Test.

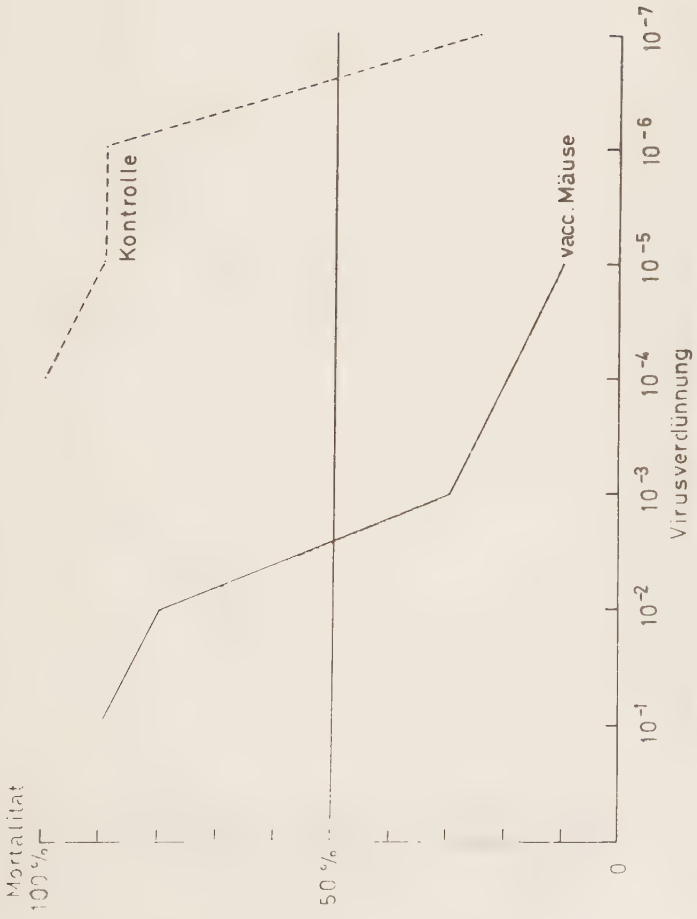


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der Zellkultur-Versuchsvaccine HTW 36 im Habel-Test.
Epidemische Mortalitätskurve bei den vacc. Mäusen.

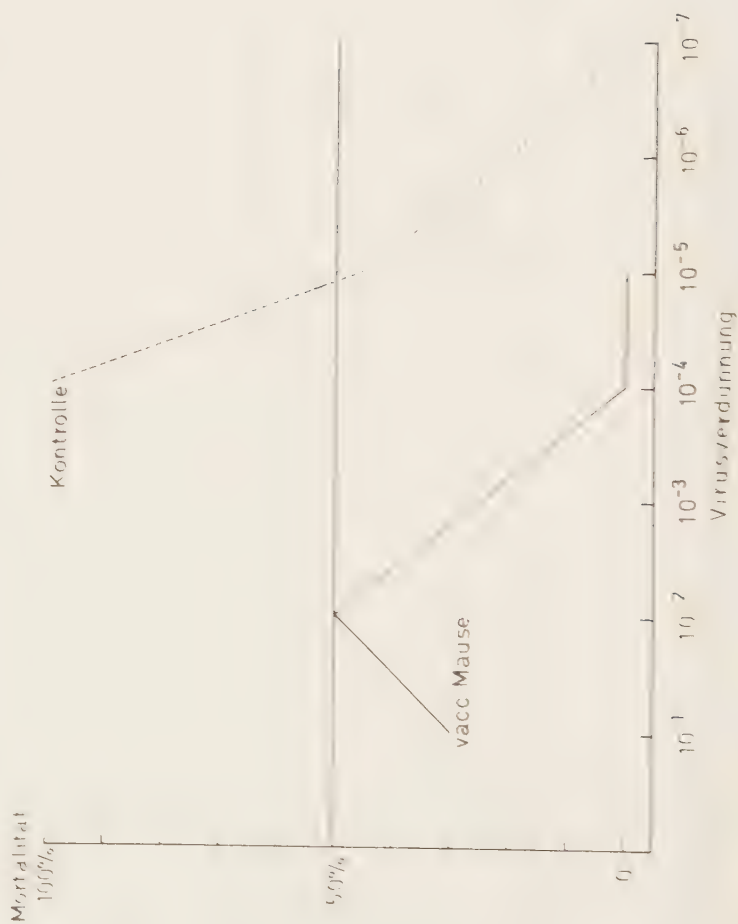


Abbildung 3: graphische Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung der
Vaccine GTW 54 a im Habel-Test.
Die Gesamtheit der Tiere ist geschützt gegen alle Virusverdünnungen.

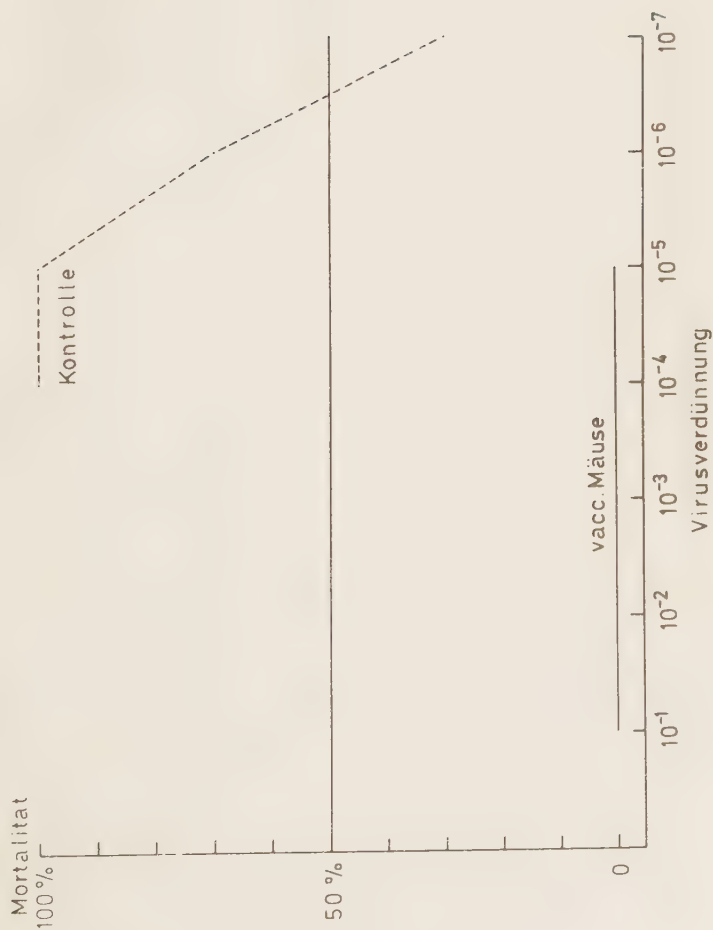


Abbildung 4 : Prüfung der Zellkultur-Vaccine GTW 54 a ($AV = 0,86$)
im N.I.H.-Test.

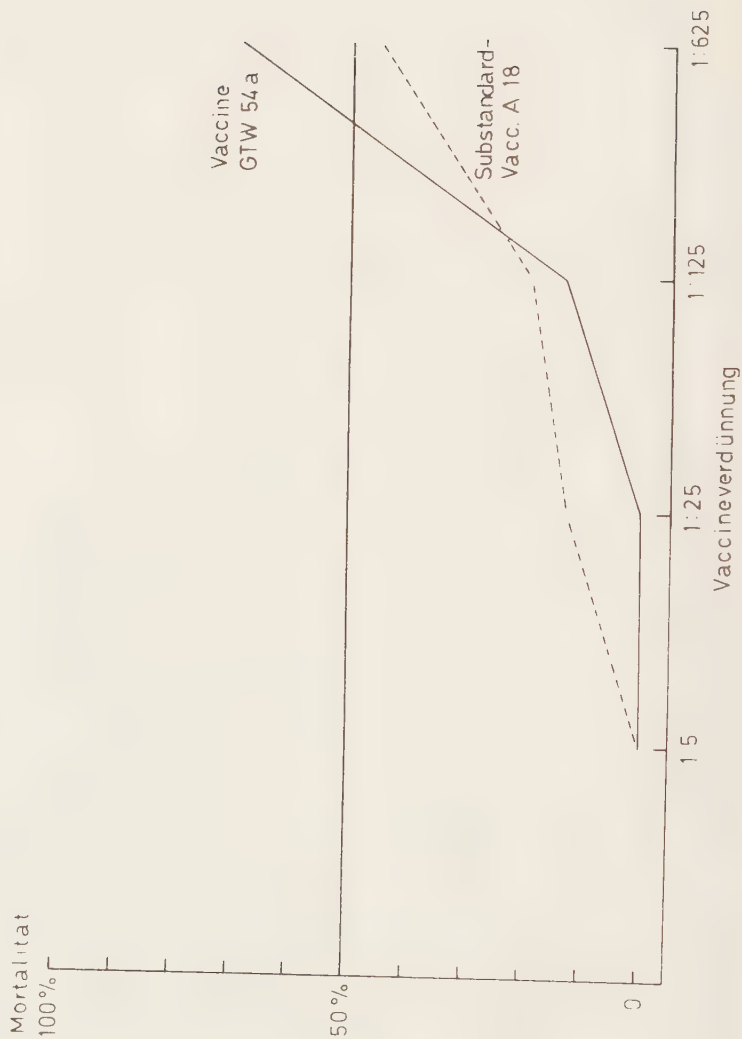
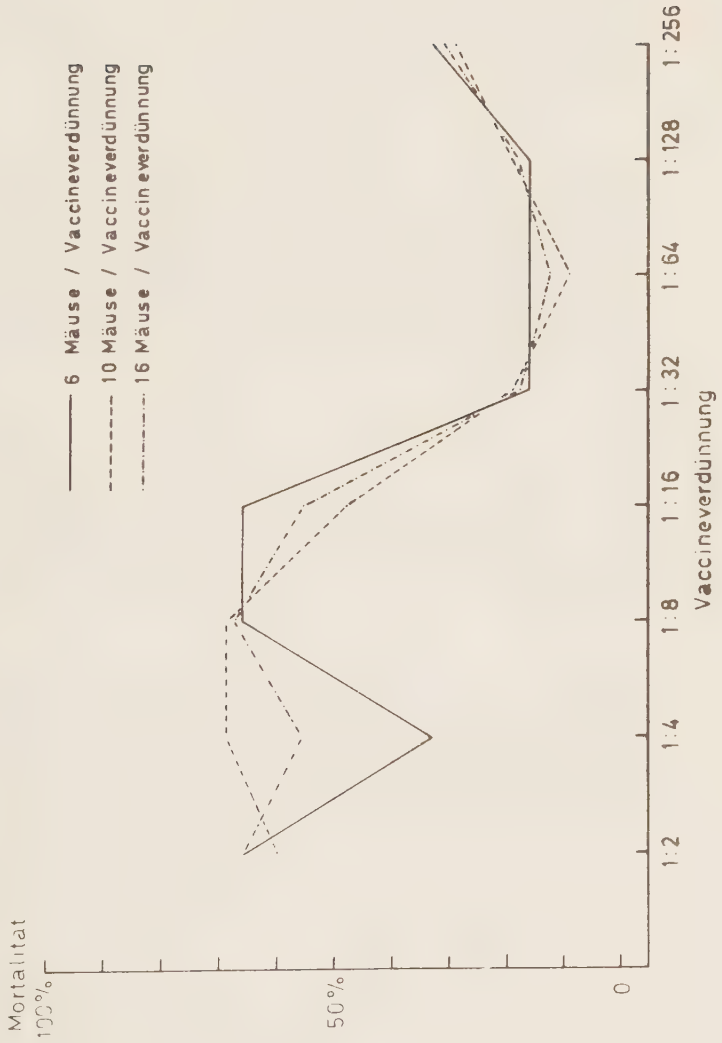


Abbildung 5 : Prüfung der Hempt-Vaccine Op.Nr.516 im Antikörperbindungstest, unter Verwendung unterschiedlicher Zahlen von Mäusen/Vacc.verdünnung.
(Tollwutviruszusatz 50 LD₅₀)



Herrn Prof. Dr. H. Krauss danke ich für die Überlassung des Themas und für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche sowie bei der Lösung aller Probleme dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch besonders Herrn Prof. Dr. Th. Schliesser, Direktor des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und Herrn Prof. Dr. R. Rott, Direktor des Instituts für Virologie für die stete Hilfsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt auch der BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn, insbesondere Herrn Prof. Dr. K. Dräger, sowie Herrn Dr. R. Barth und Herrn Dr. O. Jaeger für die großzügige Unterstützung, die die Durchführung der Versuche ermöglichte.

Alle Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Herrn G. Wießner, möchte ich für die erwiesene Hilfe und Anregungen herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Am 31. März 1943 wurde ich, Hok Liang Oei, als Sohn des Sioe Lam Oei und seiner Ehefrau Sik Nio, geb. Tjoa in Bandung, Indonesien, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bandung, trat ich 1956 in die Christliche Oberschule ein und legte 1962 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich an der Humanmedizinischen Fakultät in Jakarta und Bandung bis 1966.

Im Sommersemester 1967 begann ich an der Justus Liebig-Universität Gießen das Studium der Veterinärmedizin, das ich im Juli 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Vom 1. Oktober 1972 bis zum 31. Dezember 1973 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen eines Forschungsauftrages am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, und vom 1. Februar bis zum 30. April 1974 am Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität Gießen.

